

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-511815

(P2001-511815A)

(43) 公表日 平成13年8月14日 (2001.8.14)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード\* (参考)

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 31/711

31/337

31/337

31/4545

31/4545

38/00

45/06

45/06

48/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全115頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-536033  
(86) (22) 出願日 平成10年2月17日 (1998.2.17)  
(85) 翻訳文提出日 平成11年8月18日 (1999.8.18)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 0 3 5 1 4  
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 3 5 5 5 4  
(87) 国際公開日 平成10年8月20日 (1998.8.20)  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 0 1 , 2 8 5  
(32) 優先日 平成9年2月18日 (1997.2.18)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 8 0 1 , 6 8 1  
(32) 優先日 平成9年2月18日 (1997.2.18)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 カンジ, インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,  
サン ディエゴ, ジョン ホプキンス コ  
ート 3525  
(72) 発明者 ニールセン, ロレッタ  
アメリカ合衆国 ニュージャージー  
07946, ミリントン, ミッドベール アベ  
ニュー 60  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新生物の処置における腫瘍抑制遺伝子治療および化学治療の組合せ

(57) 【要約】

1つの実施態様において、本発明は、哺乳動物の癌細胞または過剰増殖性細胞を処置するための方法を提供する。この方法は、その細胞を腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸と接触させる工程、およびその細胞を少なくとも1つの付加的抗癌剤とも接触させる工程を包含する。本発明はまた、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸、および少なくとも1つの付加的抗癌剤を含有する薬理学的組成物、ならびに、哺乳動物の癌細胞または過剰増殖性細胞の処置のためのキットを提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. 哺乳動物の癌または過剰増殖性細胞を処置するための方法であって、該癌細胞または該過剰増殖性細胞由来の細胞を腫瘍抑制核酸と接触させる工程、および該細胞を微小管に影響する薬剤またはポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターとも接触させる工程、を包含し、

ここで、該腫瘍抑制核酸が、野生型p53タンパク質または網膜芽腫(RB)タンパク質を含む腫瘍抑制タンパク質をコードする核酸である、方法。

2. 前記微小管に影響する薬剤が、パクリタキセル、タキソール®、タキソテレ®、またはパクリタキセル誘導体である、請求項1に記載の方法。

3. 前記ポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターが、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ(FPT)インヒビターまたはゲラニルゲラニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターである、請求項1に記載の方法。

4. 前記ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ(FPT)インヒビターが、FPT 39、ファルネシル化ペプチド模倣化合物、縮合環三環系ベンゾシクロヘプタピリジン、またはファルネシル誘導体である、請求項1に記載の方法。

5. 前記方法が、前記細胞を化学治療剤と接触させる工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

6. 前記核酸が、裸のDNAプラスミド、リボソーム内のプラスミド、脂質と複合体化されたプラスミド、ウイルスベクター、AAVベクター、および組換えアデノウイルスベクターからなる群より選択されるベクターによって送達される、請求項1に記載の方法。

7. 前記ベクターがA/C/N/53である、請求項6に記載の方法。

8. 請求項1に記載の方法であって、

前記腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸が、約 $1 \times 10^9$  アデノウイルス粒子から約 $7.5 \times 10^{15}$  アデノウイルス粒子までの範囲の総用量で、単回投与で総用量、5日にわたって分割されかつ日毎投与される総用量、15日にわたって分割されかつ日毎投与される総用量、および、30日にわたって分割されかつ日毎投与される総用量からなる群より選択される処置レジメで投与され；そして

前記パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体が、24時間にわたって、約75 mg/m<sup>2</sup>から約350mg/m<sup>2</sup>までの範囲の総用量で、単回用量、1日目および2日目に日毎に投与される用量、1日目、2日目、および3日目に日毎に投与される用量、15日間の日投薬量、30日間の日投薬量、15日間の日毎の連続注入、30日間の日毎の連続注入での投与からなる群より選択される処置レジメで投与される、方法。

9. 腫瘍抑制核酸、および微小管に影響する薬剤またはポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターを含有する、薬理的組成物であって、

該腫瘍抑制核酸が、野生型p53タンパク質または網膜芽腫(RB)タンパク質を含む腫瘍抑制タンパク質をコードする核酸である、薬理的組成物。

10. 前記微小管に影響する薬剤が、パクリタキセル、タキソール®、タキソテル®、またはパクリタキセル誘導体であり、そして

前記ポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターが、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ(FPT)インヒビターまたはグラニルグラニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターである、請求項9に記載の薬理的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

新生物の処置における腫瘍抑制遺伝子治療および化学治療の組合せ

## 発明の分野

本発明は、腫瘍または転移性疾患のような過剰増殖性疾患に罹患した被験体の処置の新規な方法を記載する。特に、本発明は、腫瘍抑制遺伝子または腫瘍抑制遺伝子産物および付加的抗癌剤の組合せた使用を含む、細胞（より詳細には、新生物細胞）の過剰増殖を阻害する方法を提供する。

## 発明の背景

染色体の異常性は、しばしば遺伝子障害、変性疾患、および癌に関連する。特に、染色体全体または染色体セグメントのコピーの欠失または増加、およびゲノムの特異的領域のより高いレベルの増幅は、癌において共通の出来事である。例えば、Smith (1991) Breast Cancer Res. Treat., 18:補遺1:5-14; van de Vlier (1991) Became. Beefiest. Acta. 1072:33-50, Sato (1990) Cancer. Res., 50:7184-7189を参照のこと。実際、プロト癌遺伝子を含むDNA配列の増幅および腫瘍抑制遺伝子を含むDNA配列の欠失は、各々、腫瘍形成の頻繁な特徴である。Dutrillaux (1990) Cancer Genet. Cytogenet. 49:203-217。

p53遺伝子の変異は、ヒトの癌において最も一般的な遺伝子変化である (Bartek (1991) Oncogene 6:1699-1703, Hollstein (1991) Science, 253:49-53)。さらに、内因性野生型p53タンパク質を欠如する哺乳動物癌細胞における野生型p53の導入により、これらの細胞の新生物的表現型が抑制される（例えば、米国特許第5,532,220号を参照のこと）。

多くの利用可能な化学治療薬のうち、タキソール (Taxol)® (NSC番号: 12597

3) として市販されているバクリタキセルは、臨床試験における、薬物抵抗性腫瘍（卵巣癌および乳癌を含む）に対するその効力のために、関心を生じさせている (Hawkins (1992) Oncology, 6:17-23, Horwitz (1992) Trends Pharmacol. Sci. 13:134-146, Rowinsky (1990) J. Natl. Canc. Inst. 82:1247-1259)。

バクリタキセルと腫瘍抑制遺伝子治療との相互作用における最近の研究は、減少したレベルの腫瘍サプレッサー（すなわち、p53）が、G2/M期の停止、微小核形

成、およびp53非依存性パクリタキセル誘導性アポトーシスの増加と関連したことを示す。対照的に、完全なp53を有する生存細胞は、有糸分裂を通じて進行し、そして続くG1期で一時的に蓄積し、同時にp53およびp21<sup>cip1.waf1</sup>タンパク質レベルは増加する(Wahl (1996) Nature Med. 2:72-79)。同様に、Hawkins (1996) Canc. Res. 56:892-898は、p53の不活化が、特定の抗有糸分裂剤(パクリタキセルを含む)に対する感受性を増強することを示した。この著者らは、p53がDNA修復における役割を果たし得、それによって、細胞が、薬物の存在下にあると、S期を通じてさらに容易に進行することを可能にすることを示唆した。従って、これらの研究は、腫瘍抑制遺伝子治療および抗有糸分裂剤による薬物治療(特に、パクリタキセル治療)が、くい違って作用することを示唆する。

#### 発明の要旨

本発明は、過剰増殖性哺乳動物細胞を処置する方法を提供する。本発明は、部分的に、腫瘍サプレッサー(例えば、p53)遺伝子治療との組合せでの付加的抗癌剤が、新生物細胞または腫瘍抑制活性を欠失する他の細胞の増殖を阻害する増強された効果を提供するという、驚くべき発見を前提とする。

従って、1つの実施態様において、本発明は、細胞を、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸、および少なくとも1つの付加的抗癌剤と接触させることによって、癌細胞または過剰増殖性細胞を処置する方法を提供する。幾つかの実施態様において、本方法は、腫瘍抑制タンパク質または核酸、および付加的抗癌剤と、少なくとも1つの化学治療剤との同時投与を含む。例えば、腫瘍抑制核酸(例えば、p53をコードする核酸)は、付加的抗癌剤(例えば、パクリタキセル)およびDNA損傷剤(例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ナベルピン(navelbine)(タルテート(tartate)ピノレルピン))とともに投与され得る。

癌細胞または過剰増殖性細胞は、しばしば新生物細胞である。細胞が腫瘍に存在する場合、本方法は腫瘍成長を阻害し、それによって癌を処置する方法を提供する。このような癌には、卵巣癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝癌、

メラノーマ、網膜芽腫、乳癌、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、脳腫瘍、子宮頸癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、細網内皮組織の腫瘍、ウイルス腫瘍、星状細胞

腫、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、卵巣癌、骨肉腫、腎臓癌、または頭頸部癌が含まれるが、これらに限定されない。

好ましい付加的抗癌剤は、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体であり、一方、好ましい腫瘍抑制核酸は、p53タンパク質およびそのアナログ、ならびに網膜芽腫（RB）タンパク質から成る群から選択される腫瘍抑制タンパク質をコードする核酸である。特に好ましい腫瘍抑制核酸は、野生型p53タンパク質をコードし、そして特に好ましい網膜芽腫タンパク質は、p110<sup>RB</sup> またはp56<sup>RB</sup> である。

腫瘍抑制核酸は、好ましくはベクターによって標的細胞に送達される。このようなベクターのウイルスは、標的細胞中での腫瘍抑制核酸の発現を可能にするように、組換えDNA技術によって改変されている。これらのベクターは、非ウイルス（例えば、プラスミド）またはウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス）の起源のベクターに由来し得る。本発明の好ましい実施において、ベクターは、組換的に改変されたアデノウイルスベクターである。非ウイルスベクターは、好ましくは、細胞膜を通してDNAの侵入を容易にするために、薬剤と複合体化される。このような非ウイルスベクター複合体の例は、DNAおよび脂質ベース送達システムの凝縮を容易にするポリカチオン性薬剤を用いる処方物を含む。脂質ベース送達システムの例は、核酸のリポソームに基づく送達を含む。

特に適切なアデノウイルスベクター（例えば、野生型p53タンパク質をコードする核酸の送達のために）は、タンパク質IX DNAの部分的または全体的な欠失を含む。1つの実施態様において、タンパク質IX遺伝子配列の欠失は、5'ウイルス末端からの約3500bp～5'ウイルス末端からの約4000bpに及ぶ。ベクターは、アデノウイルス初期領域3および／またはアデノウイルス初期領域4における非必須DNA配列の欠失を含み、そして1つの実施態様において、欠失は、DNA配列E1aおよび／またはE1bである。ヒトp53 cDNAの送達に特に好ましい組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス2型主要後期プロモーターまたはヒトCMVプロモーター、およびアデノウイルス2型3部構成（tripartite）リーダーcDNAを含

む。このような好ましいアデノウイルスベクターの1つはACN53である。

好ましいパクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体は、パクリタキセルおよび／またはタキソテレ(Taxolere)<sup>®</sup>を含み、パクリタキセル(タキソール<sup>®</sup>)が最

も好ましい。別の好ましい付加的抗癌剤は、エポチロン(Epothilone)である。1つの好ましい実施態様において、腫瘍サプレッサーはA/C/N/53であり、そして付加的抗癌剤は、パクリタキセルである。

腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸は、薬理学的に受容可能な賦形剤に分散され得る。同様に、付加的抗癌剤(例えば、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体)は、薬理学的に受容可能な賦形剤に分散され得る。腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸および上記パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体は、共に、単一の組成物(1つまたは複数の賦形剤を含む)に分散され得る。

腫瘍サプレッサー(タンパク質または核酸)および／または付加的抗癌剤は動脈内、静脈内(例えば、注射)、腹腔内、および／または腫瘍内で、一緒にまたは連続的に投与され得る。好ましい投与部位は、肝動脈内、腹腔内、または頭部の細胞(例えば、神経細胞)を処置することをが所望である場合は、頸動脈系の動脈への投与を含む。

腫瘍抑制タンパク質または核酸は、単回用量または複数の処置(例えば、各々少なくとも6時間の間隔を開ける)、より好ましくは約24時間間隔で少なくとも3回の処置で投与され得る。

別の好ましい実施態様において、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸は、(付加的抗ガン剤とともに、またはなしで)約 $1 \times 10^9$ ～約 $1 \times 10^{14}$ 、または約 $1 \times 10^9$ ～約 $7.5 \times 10^{15}$ 、好ましくは約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$ の範囲のアデノウイルス粒子の全用量で、以下：単回用量における全用量、5日にわたって日毎投与される全用量、15日にわたって日毎投与される全用量、および30日にわたって日毎投与される全用量からなる群から選択される処置レジメで、投与される。用量はまた、連続的に1～30日の間投与され得る。パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体は、1時間、3時間、6時間、または24時間にわたって $75 \sim 350 \text{mg/m}^2$ の範囲の全用量で、単回用量で、第1日目および第2日目の各々の日に日毎投与される全用量で、第1日目、第2日目、および第3日目の各々の日に日毎投与

され

る全用量で投与され、15日間の日毎投薬量で、30日間の日毎投薬量で、15日間の日毎の連続注入で、30日間の日毎の連続注入での投与からなる群から選択される処置レジメで投与される。好ましい用量は、24時間、 $100\sim 250\text{mg}/\text{m}^2$ である。あるいは、パクリタキセルまたは誘導体は、毎週 $60\text{mg}/\text{m}^2$ で投与され得る。この投与方法は、2サイクル以上（より好ましくは3サイクル）繰り返され、そしてこの2以上のサイクルは、3週間または4週間の間隔を開けられ得る。

いくつかの好ましい実施態様において、 $7.5\times 10^9\sim 7.5\times 10^{15}$ 、好ましくは約 $1\times 10^{12}\sim 7.5\times 10^{13}$ の範囲のアデノウイルス粒子の日毎用量は、30日間まで（例えば、2日、または2～5日から14日、または30日のレジメであり、同じ用量が各々の日に投与される）各日投与され得る。複数のレジメは、21～28日の繰り返しサイクルで繰り返され得る。好ましい投与経路は、動脈内（例えば、肝動脈内）、腫瘍内、および腹腔内を含む。

腫瘍抑制核酸（例えば、p53）が、付加の抗ガン剤（例えば、パクリタキセル）およびDNA損傷剤（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、またはナベルピン）と共にアデノウイルスベクターにおいて投与される場合、アデノウイルスベクターは、5～14日間、約 $7.5\times 10^{12}\sim 7.5\times 10^{13}$ のアデノウイルス粒子/日で、投与される。アデノウイルスベクターおよびパクリタキセルは、カルボプラチンとともに投与される場合、用量は代表的には、 $7.5\times 10^{13}$ アデノウイルス粒子/日である。例えば、約 $7.5\times 10^{12}$ アデノウイルス粒子の日毎用量が、肺への投与のために使用され得る。

本発明はまた、哺乳動物癌または過剰増殖性細胞の処置のためのキットを提供する。キットには、本明細書中に記載される腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸（より好ましくは、野生型p53タンパク質または核酸（例えば、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター）、または網膜芽腫（RB）タンパク質または網膜芽腫核酸）；および本明細書中に記載される付加的抗癌剤（例えば、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体）、および/または必要に応じて本明細書中に記載の任意の他の化学治療剤が含まれる。キットは、必要に応じて、癌または



過剰増殖性細胞の成長または増殖を阻害する、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸、および付加的抗癌剤（および必要に応じて他の化学治療剤）をさらに含

む。1つの特に好ましいキットは、A/C/N/53およびパクリタキセルを含む。

別の実施態様において、本発明は、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸および付加の抗ガン剤を含む薬理学的組成物を提供する。種々の実施態様において、薬理学的組成物は、必要に応じて、本明細書中に記載の任意の他の化学治療化合物を含む。1つの特に好ましい組成物は、p53核酸（例えば、A/C/N/53）およびパクリタキセルを含む。腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制タンパク質および化学治療剤（例えば、パクリタキセル）は、種々の賦形剤であり得、または本明細書中に記載のように単一の賦形剤中に含まれ得る。複数の賦形剤が存在する場合、賦形剤は混合され得るか、または別々に（例えば、マイクロカプセル中で）保持され得る。

なお別の実施態様において、本発明は、哺乳動物癌細胞または過剰増殖性細胞を含む組成物を提供し、ここで、上記細胞は外因性腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制タンパク質を含む。細胞は、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体のような、付加の抗ガン剤をさらに含み得る。外因性腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制タンパク質は、本明細書中に記載の任意の1つ以上の腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制タンパク質であり得る。同様に、細胞は、本明細書中に記載の任意の1つ以上の過剰増殖性および／または癌細胞であり得る。

なお別の実施態様において、本発明は、転移性細胞の処置方法を提供する。本方法は、細胞を腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制ポリペプチドと接触させる工程を包含する。適切な腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制ポリペプチドは、本明細書中に開示される任意の腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドを含む。本方法は、細胞を本明細書中に開示される任意の付加の抗ガン剤と接触させる工程をさらに包含し得る。特に好ましい実施態様において、本方法は、腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドの外科的創傷への局部投与を含む。

別の実施態様において、本発明は、特に好ましい投与レジメを提供する。従って、1つの実施態様において、本発明は、哺乳動物細胞の処置方法を提供し、本

方法は、細胞に全用量の腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸を投与する工程を包含し、ここで上記全用量は、上記腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸の複数の漸増用量で投与される。好ましい複数投与は、各々少なくとも約6時間の間隔を開ける。1つの好ましい投与は、約24時間の間隔での少なくとも3回の処置である。

別の実施態様において、本発明は、哺乳動物細胞の処置方法を提供する。本方法は、細胞に、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸の全用量を投与する工程を包含し、ここで全用量は、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸の複数の投与の漸増用量で投与される。投与は、少なくとも約6時間の間隔であり得る。本方法は、少なくとも3つの漸増用量を少なくとも含むものを含み得、そして用量は日毎投与され得る。1つの実施態様において、本方法は、約24時間間隔の少なくとも3回の処置を含み得る。別の実施態様において、本方法は、腫瘍投与を含み得、腫瘍抑制核酸は、約 $1 \times 10^9$ ～約 $7.5 \times 10^{15}$ 、または約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$ の範囲のアデノウイルス粒子の全用量で、アデノウイルス粒子は以下：単回用量における全用量、5日にわたって日毎投与される全用量、15日にわたって日毎投与される全用量、および30日にわたって日毎投与される全用量からなる群から選択される処置レジメで投与される。本方法は、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体を、単回用量、(第1日目および第2日目に日毎投与される用量で、第1日目、第2日目、および第3日目における日毎投与される用量で、15日間の日毎投与量で、30日間の日毎投与量で、15日間の日毎の連続注入で、30日間の日毎連続注入での投与からなる群から選択される処置レジメにおいて、24時間にわたって約 $75\text{mg}/\text{m}^2$ ～約 $350\text{mg}/\text{m}^2$ の範囲の全用量で投与する工程をさらに含み得る。これらの処置レジメは、2以上のサイクル繰り返され得、そしてこの2以上のサイクルは、3または4週間の間隔を開けられ得る。このように、処置される細胞は、卵巣癌、中皮腫、膀胱癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝癌、メラノーマ、網膜芽腫、乳癌、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、脳腫瘍、子宮頸癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、腎臓癌、および頭頸部癌からなる群から

選択される癌を含む新生物細胞を含む。処置は、好ましくは、腫瘍の体積の測定によってアッセイされるように、腫瘍の成長または増殖の阻害を生じる。

本発明はまた、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸および少なくとも1つの付加の抗ガン剤を含む、薬理学的組成物を提供する。付加の抗ガン剤は、バク

リタキセルまたはバクリタキセル誘導体であり得る。腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸は、野生型p53タンパク質をコードする核酸、網膜芽腫(RB)タンパク質をコードする核酸、野生型p53タンパク質、および網膜芽腫(RB)タンパク質からなる群から選択され得る。

網膜芽腫タンパク質は、p110<sup>RB</sup> またはp56<sup>RB</sup> であり得る。核酸は、組換えアデノウイルスベクターに含まれ得る。核酸は、タンパク質IX DNAの部分的または全体的な欠失を含み、そしてp53タンパク質をコードする核酸を含む、組換えアデノウイルスベクターに含まれ得る。1つの実施態様において、タンパク質IX遺伝子配列の欠失は、5'ウイルス末端からの約3500bpから5'ウイルス末端からの約4000bpに及び得る。DNAの欠失は、E1aおよびE1bと称される配列を含み得る。組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス2型主要後期プロモーターまたはヒトCMVプロモーター、アデノウイルス2型3部構成リーダーcDNA、およびヒトp53cDNAをさらに含み得る。好ましい実施態様において、ベクターは、A/C/N/53である。組成物は、バクリタキセル、またはバクリタキセル誘導体、またはバクリタキセルアナログであり得る。

本発明は、哺乳動物癌細胞または過剰増殖性細胞を含む組成物をさらに提供し、ここで、上記細胞は、外因性腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制タンパク質および付加の抗ガン剤を含む。腫瘍抑制核酸は、野生型p53タンパク質および網膜芽腫(RB)タンパク質からなる群から選択される腫瘍抑制タンパク質をコードする核酸であり得る。網膜芽腫タンパク質は、p110<sup>RB</sup> またはp56<sup>RB</sup> であり得る。細胞は哺乳動物に存在し得る。細胞は新生物細胞であり得、そして新生物細胞は、卵巣癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝癌、メラノーマ、網膜芽腫、乳癌、結腸直腸癌、白血病、リンパ腫、脳腫瘍、子宮頸癌、肉腫、前立腺癌、膀胱癌、細網内皮組織の腫瘍、ウィルムス腫瘍、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞

腫、骨肉腫、腎臓癌、および頭頸部癌からなる群から選択される癌を含み得る。

本発明は、転移性細胞を処置する方法を提供する。この方法は、上記細胞を、腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制ポリペプチドおよび付加の抗ガン剤と接触させる工程を包含する。接触工程は、腫瘍抑制核酸の外科的創傷への局部投与を含み得る。本方法は、化学治療剤の同時投与をさらに含み得、そして化学治療剤はシスプラ

チン、カルボプラチン、またはナベルピンであり得る。

#### 定義

用語「付加的(adjunctive)抗癌剤」は、以下の活性のうちの少なくとも1つを有する薬剤をいう：微小管形成または作用を調節する能力、ポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼ活性を阻害する能力、新脈管形成を阻害する能力、または内分泌活性を阻害する能力。本発明において有用な付加的抗癌剤は、以下により詳細に記載される。本明細書中において使用される、本発明の付加的抗癌剤は、DNA損傷活性を有する化合物を含まない。

「腫瘍抑制遺伝子」は、機能損失変異が発癌性である核酸である。従って、以下を除いて健常な細胞における腫瘍抑制遺伝子の正常な発現の非存在、変異、または破壊は、新生物状態に達する細胞の可能性を増大させるか、または新生物状態に達する細胞を生じる。逆に、機能的な腫瘍抑制遺伝子またはタンパク質が細胞中に存在する場合、その存在は、宿主細胞の腫瘍形成性、その悪性腫瘍、またはその過剰増殖性表現型を抑制する。本定義内の腫瘍抑制核酸の例は、p110<sup>RB</sup>、p56<sup>RB</sup>、p53、ならびに本明細書中および同時係属出願USSN 08/328,673（1994年10月25日出願）において記載される他の腫瘍サプレッサーを含むが、これらに限定されない。腫瘍抑制核酸は、腫瘍抑制遺伝子、またはそれに由来する核酸（例えば、それぞれの腫瘍抑制ポリペプチドの活性フラグメントをコードする、cDNA、cRNA、mRNA、およびその部分配列）、ならびにこれらの配列を含むベクターを含む。

「腫瘍抑制ポリペプチドまたはタンパク質」は、細胞に存在する場合、細胞の腫瘍形成性、その悪性腫瘍、またはその過剰増殖性表現型を減少するポリペプチ

ドをいう。

用語「ウイルス粒子」は、インタクトなビリオンをいう。感染性アデノウイルスのウイルス粒子の濃度は、代表的には例えば、Huyghe (1995) Human Gene Ther. 6:1403-1416によって記載されるような、DNAの分光光度計検出によって決定される。

用語「新生物」または「新生物性」は、その細胞型についての正常な成長の限界を超える速度での細胞成長および／または細胞分裂を記載することが意図される。

用語「腫瘍形成性の」または「腫瘍形成性」は、腫瘍を形成する能力、または腫瘍形成を引き起こし得る能力を有することを意味することが意図される。

句「細胞を処置する」は、疾患細胞の1つ以上の疾患特徴の阻害または寛解をいう。新生物である癌細胞（例えば、内因性野生型腫瘍抑制タンパク質を欠く、哺乳動物癌細胞）に関して使用される場合、句「細胞を処理すること」は、新生物表現型の緩和または除去をいう。代表的には、そのような処理は、処理（例えば、付加的抗癌剤および／または腫瘍抑制核酸もしくはポリペプチド）を除けば同じ条件下である同じ細胞と比較した場合、細胞の阻害（成長(growth)および／または増殖(proliferation)の減少または休止）を生じる。そのような阻害は、細胞死（例えば、アポトーシス）を含み得る。腫瘍に関して使用される場合、これらの用語は腫瘍塊の成長または増殖の阻害をいう（例えば、体積測定の場合）。そのような阻害は、腫瘍塊を含む細胞の成長速度および／または増殖速度および／または細胞死における減少を介して媒介され得る。成長の阻害または増殖の阻害は、細胞の表現型における改変（例えば、健常な細胞の形態学的特徴の回復、接触阻害の回復、侵襲性表現型の損失、足場非依存性増殖(anchorage independent growth)の阻害など）によって達成され得る。この開示の目的のために、疾患細胞は、1つ以上の病理学的形質を有する。疾患細胞におけるこれらの形質は、とりわけ、1つ以上の腫瘍抑制タンパク質の欠損した発現を含み得る。欠損した発現は、1つ以上の機能的な腫瘍抑制タンパク質の完全な損失、または1つ以上の機能的な腫瘍抑制タンパク質の発現レベルにおける減少によって特徴付けら

れ得る。このような細胞は、しばしば、新生物性および／または腫瘍形成性である。

用語「全身投与」は、本発明の組換えアデノウイルスベクター、または本明細書中に記載される付加の抗癌化合物もしくは化学治療化合物のような組成物または薬物の、循環系への組成物または薬物の導入を生じる様式での投与をいう。用語「領域投与(regional administration)」は、特定の解剖学的空間（例えば、腹腔内、クモ膜下、硬膜下）または特定の器官などへの、組成物または薬物の投与をいう。例えば、領域投与は、肝臓への領域投与のための、肝臓の動脈への、

組成物または薬物の投与を含む。用語「局所投与(local administration)」は、限定または限局された解剖学的空間への組成物または薬物の投与（例えば、腫瘍塊への腫瘍内注射、皮下注射、筋肉内注射など）をいう。当業者は、局所投与または領域投与もまた、循環系への組成物または薬物の侵入を生じ得ることを理解する。

本明細書中において、用語「減少した腫瘍形成性」を使用して、過剰増殖性（例えば、新生物性）細胞の、より増殖性ではない状態への転換をいう。腫瘍細胞の場合において、「減少した腫瘍形成性」は、腫瘍細胞へ転換する能力が減少または除去される、より腫瘍形成性ではないか、もしくは非腫瘍形成性になった腫瘍細胞、または非腫瘍細胞を意味することが意図される。腫瘍形成性の減少した細胞は、インビボにおいて腫瘍を形成しないか、またはインビボでの腫瘍増殖の出現前に数週間から数カ月まで延長した遅滞期を有するかのいずれかである。腫瘍形成性の減少した細胞はまた、同じ生理学的環境（例えば、組織、生物の年齢、生物の性別、月経周期における時期など）において成長する十分に不活化または非機能的な腫瘍抑制遺伝子を有する細胞の同じ型と比較して、より緩慢に成長する3次元腫瘍塊を生じ得る。

本明細書中において使用する、遺伝子またはポリペプチドの「活性フラグメント」は、腫瘍抑制活性を有するタンパク質をコードする能力を保持する、遺伝子またはそれに由来する核酸（例えば、cDNA）のより小さな部分（部分配列）を含む。同様に、ポリペプチドの活性フラグメントは、腫瘍抑制タンパク質を有する

ポリペプチドの部分配列をいう。活性フラグメントの1つの例は、例えば、同時係属のUSSN 08/328,673 (1994年10月25日出願)に記載されるようなp56<sup>RB</sup>である。

用語「悪性腫瘍」は、転移する能力を有する腫瘍形成性細胞を記載することが意図される。

本明細書中で使用する「核酸」は、DNAまたはRNAであり得る。核酸はまた、ポリメラーゼによる正確な読み過ごしを可能にし、そしてその核酸によってコードされるポリペプチドの発現を改変しない、改変されたヌクレオチドを含み得る。

句「ヌクレオチド配列」は、個々の単鎖または二重鎖のいずれかとして、センスおよびアンチセンス鎖の両方を含む。

句「DNA配列」は、ヌクレオチド塩基のアデノシン、チミジン、シトシン、およびグアノシンから構成される、一本鎖または二本鎖のDNA分子をいう。

句「～をコードする核酸配列」は、特定のタンパク質またはペプチドの発現を指向する核酸をいう。核酸配列は、RNAに転写されるDNA鎖配列、およびタンパク質に翻訳されるRNA配列の両方を含む。核酸配列は、全長核酸配列、ならびに全長配列に由来する非全長配列の両方を含む。配列は、特定の宿主細胞におけるコドン優先(preference)を提供するように導入され得る、天然の配列の縮重コドンを含むことがさらに理解される。

句「発現カセット」は、このような配列と適合性の宿主における構造遺伝子の発現をもたらし得るヌクレオチド配列をいう。そのようなカセットは、少なくともプロモーター、および必要に応じて転写終結シグナルを含む。発現に影響を及ぼすのに必要か、またはそれに有用なさらなる因子はまた、本明細書中に記載のように使用され得る。

本明細書中で使用する用語「作動可能に連結された」は、プロモーターがDNA配列の転写を媒介するような、DNA配列から上流のプロモーターの連結をいう。

「単離された」または「実質的に純粋な」は、腫瘍抑制タンパク質もしくはポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸配列をいう場合、腫瘍抑制タンパク質もしくはポリペプチドまたはそのフラグメントとは異なるタンパク質

またはペプチドをコードしない単離された核酸をいう。

用語「組換え体」は、天然または内因性供給源から単離され、そして天然に存在する隣接ヌクレオチドを欠失または天然に存在しない隣接ヌクレオチドを提供するように化学的または酵素学的に改変されたDNAをいう。隣接ヌクレオチドは、ヌクレオチドの所望の配列または部分配列から上流または下流のいずれかであるヌクレオチドである。

「ベクター」は、細胞を感染、トランスフェクト、一過性または永久に形質導入し得る核酸を含む。ベクターは、裸の核酸、またはタンパク質もしくは脂質と複合体化された核酸であり得ることが理解される。ベクターは、必要に応じて、ウイルス性もしくは細菌性の核酸および／またはタンパク質、ならびに／あるいはメンブレン（例えば、細胞膜、ウイルス脂質エンベロープなど）を含む。ベクターはしばしば、目的の核酸をプロモーターの制御下に置く発現カセットを含むことが認識される。ベクターは、DNAのフラグメントが付着され、そして複製されるようになり得るレプリコン（例えば、プラスミド、バクテリオファージ）を含むが、これらに限定されない。従って、ベクターは、RNA、自律的自己複製環状DNA（プラスミド）を含むがこれらに限定されず、そして発現プラスミドおよび非発現プラスミドの両方を含む。組換え微生物または細胞培養が、「発現ベクター」を宿す(host)として規定される場合、これは、染色体外環状DNAおよび宿主染色体に組み込まれているDNAの両方を含む。ベクターが宿主細胞によって維持されている場合、ベクターは、有糸分裂の間に自律的構造として細胞によって安定に複製され得るか、または宿主ゲノム内に組み込まれる。

用語有効量は、細胞成長および／または細胞増殖を制御する際に、ポジティブな効果を達成する、ベクター量または薬物量を意味することが意図される。

本明細書中で使用される略語「C.I.U.」は、「細胞感染単位 (cellular infectious units)」を表す。C. I.U. は、ウイルス性ヘキソンタンパク質ポジティブ細胞（例えば、293細胞）を48時間の感染時間後に測定することによって計算される (Huyghe (1995) Human Gene Ther. 6:1403-1416)。

本明細書中で使用される略語「m.o.i.」は、「感染多重性 (multiplicity of



infection)」をいい、そして細胞あたりのC.I.U.である。

本明細書中で使用される用語「パクリタキセル」は、タキソール®として商業的に公知の薬物をいう。タキソール®は、有糸分裂に適切な構造に再形成し得な

い安定化微小管束へのチューブリン部分の重合化を増強することによって、真核生物細胞の複製を阻害する。

用語「細胞を接触させる」は、薬物および／または核酸と接触することをいう場合、薬物および／または核酸が細胞中にインターナリゼーションされるような様式で接触することをいうように、本明細書中で使用される。この文脈において、細胞を核酸と接触させることは、細胞を核酸でトランスフェクトすることと等価である。薬物が親油性であるか、または核酸が脂質（例えば、カチオン性脂質）と複合体化される場合、単に接触させることは、細胞への輸送（能動的、受動的、および／または拡散性(diffusive)）を生じる。あるいは、薬物および／または

核酸は、それ自体であり得るか、またはキャリア組成物との組み合わせであり得、細胞へ能動輸送され得る。従って、例えば、核酸が感染性ベクター（例えば、アデノウイルス）中に存在する場合、ベクターは、細胞への核酸の取り込みを媒介し得る。核酸は、細胞外レセプターと特異的に相互作用する薬剤と複合体化され、細胞への核酸の送達を促進し得る（例えば、米国特許第5,166,320号および同第5,635,383号において記載されるようなリガンド／ポリカチオン／DNA複合体を含む）。さらに、ウイルス性送達は、細胞標的化部分を取り込むように、ウイルスゲノムのknobまたは線維ドメインを組換え改変することによって増強され得る。

本明細書中で「A/C/N/53」、「A/M/N/53」、p110<sup>Rb</sup>、p56<sup>Rb</sup>として命名される構築物は、同時係属出願USSN 08/328,673（1994年10月25日出願）、国際出願WO 95/11984において、そのように命名される構築物をいう。

「保存的置換」は、タンパク質を記載する場合、タンパク質活性を実質的に改変しないタンパク質のアミノ酸組成における変化をいう。従って、特定のアミノ酸配列の「保存的に改変された改変体」は、重要なアミノ酸の置換が活性を実質

的に改変しないように、タンパク質活性について重要ではないそれらのアミノ酸のアミノ酸置換、または類似の特性（例えば、酸性、塩基性、正または負の荷電、極性または非極性など）を有する他のアミノ酸でのアミノ酸の置換をいう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該分野において周知である。例えば、以下の6つの群は、それぞれ、互いに保存的な置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T) ；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K) ；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ；および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) 。

Creighton(1984)Proteins W.H. Freeman and Companyもまた参照のこと。さらに、コードされる配列におけるアミノ酸の単一のアミノ酸または低い割合を改変、

付加、または欠失させる個々の置換、欠失、または付加はまた、「保存的に改変された改変体」である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、種々の濃度のp53 (A/C/N/53) および／またはタキソール®による、SK-OV-3卵巣腫瘍細胞のインビトロ阻害を示す。

図2は、図1において示される実験についてのイソボログラム (isobologram) 分析を提供する。細胞をp53処理の24時間前にタキソール®で前処理した場合の、タキソール®とp53 (A/C/N/53) との間の相乗作用を観察した。

図3a、3b、および3cは、ヌードマウスにおけるヒト乳癌異種移植片に対するp53 Adの効力を示す。マウスに、1匹のマウスあたり総用量 $2.2 \times 10^9$  C.I.U. アデノウイルスを、0～4日目および7～11日目の10回の注射に分割して投与した。マウスを、p53 Ad、 $\beta$ -gal Ad、またはビヒクル単独で処置した。図3aは、MDA-MB-231腫瘍に関する結果を示す。図3bは、MDA-MB-468(-468)腫瘍に関する結果を示す。

し、そして図3cは、MDA-MB-435(-435)腫瘍に関する結果を示す。

図4aおよび4bは、MDA-MB-231(-231)腫瘍(図4a)およびMDA-MB-468腫瘍(図4b)についての、p53 Ad(A/C/N/53)用量応答曲線を提供する。マウスに、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  C.I.U. p53 Ad(A/C/N/53)を、0～4日目および7～11日目の10用量に分割して腫瘍周囲に投与した。平均%阻害を、14、15、18、21、24、28、30、32、および35日目(MDA-MB-468腫瘍のみ、35日目について)に、各p53 Ad用量での腫瘍体積と、緩衝液処理腫瘍とを比較することによって計算した。-231腫瘍は0日目に平均して $22.5 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ であり、-468腫瘍は0日目に平均して $33.1 \pm 1.8 \text{ mm}^3$ であった。

図5は、単回ボーラスまたは分割した用量で投与された場合の治療剤の効力の比較を提供する。腫瘍(MDA-MB-231)を、1週間～3週間で、1週あたり $2.2 \times 10^8$  C.I.U.の総量で投与した。

図6は、大きく十分に確立した腫瘍に対する、低用量p53 Adの複数周期の効力を示す。総量 $1.32 \times 10^9$  C.I.U.のp53 Adを、MDA-MB-468異種移植片に6週間にわたって投与した。(P=コントロール腫瘍増殖率における定常値；E=投与の終わり)。

図7a、7b、および7cは、単回ボーラス注射(図7a)または3回注射(図7b)もしくは5回注射(図7c)に分割して、 $1 \times 10^9$  C.I.U. p53 Ad(A/C/N/53)を投与される、ヌードマウスにおけるMDA-MB-468腫瘍のインビボ阻害を示す。

図8は、低用量デキサメタゾンの、scidマウスにおけるNK細胞によって媒介される腫瘍増殖の阻害を抑制する能力を示す。MDA-MB-231腫瘍に、14～18日目および21～25日目に投与される10回注射へ分割された、総量 $2 \times 10^9$  C.I.U.の $\beta$ -gal Ad( $1.1 \times 10^{11}$  ウイルス粒子)を投与した。皮下デキサメタゾン(またはプラセボ)ペレットは、1日あたり $83.3 \mu\text{g}$ のステロイドを放出した。

図9. 正常細胞および腫瘍細胞における、p53とシスプラチンとの組み合わせ治療の比較。

#### 詳細な説明

本発明は、細胞の成長および／または増殖、より詳細には癌細胞の成長および

増殖を阻害する新しい方法を提供する。1つの実施態様において、本方法は、腫瘍抑制核酸、または腫瘍抑制タンパク質、および付加的抗癌剤と、細胞とを接触させる工程を包含する。代表的には、使用される腫瘍抑制タンパク質または核酸は、欠失している腫瘍抑制タンパク質と同じ種である。従って、細胞が内因性p53活性を欠く場合、p53タンパク質またはp53核酸を使用する。

以前の研究において記載される結果（例えば、Wahlら、（1996）Nature Med. , 2(1):72-79、およびHawkinsら、（1996）Canc. Res. 56:892-898を参照のこと）と対照的に、内因性野生型腫瘍抑制タンパク質（すなわち、多くの新生物性細胞）を欠くか、または欠失している哺乳動物細胞の、付加的抗癌剤（例えば、パクリタキセル（タキソール®））および腫瘍抑制遺伝子またはポリペプチド（例

えば、p53）の両方での処置は、化学的処置または腫瘍抑制構築物単独で観察された阻害より、細胞の増殖および／または成長の大きな阻害を生じることは、本発明の驚くべき発見であった。さらに、付加抗癌剤での前処置が、腫瘍抑制核酸の抗増殖性効果を劇的に増大させることは、本発明の発見であった。特定の理論によって縛られることなしに、付加抗癌剤がこの増強された効果に貢献し得る可能

な手段は、以下であると考えられている：種々のウイルス遺伝子治療ベクター（例えば、アデノウイルスベクター）のトランスフェクション効率を増大させること；または腫瘍抑制遺伝子の発現レベルを増大させること；または細胞内ウイルス輸送を補助する微小管を安定化させること；または種々の細胞内機構（例えば、シグナル伝達経路、アポトーシス経路、細胞周期(cycling)経路）の相互作用を介して増強された効果を提供すること。

従って、1つの実施態様において、本発明は、細胞の内因性野生型腫瘍抑制タンパク質を欠くか、または欠失する疾患哺乳動物細胞を、付加的抗癌剤ならびに腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドと接触させることによって阻害する方法を提供する。細胞が腫瘍内に存在する場合、本方法は、腫瘍増殖を阻害し、それによって癌を処置する方法を提供する。特に好ましい腫瘍抑制核酸またはポリペプチドは、p53、RB、h-NUC(例えば、Chen (1995) Cell Growth Differ. 6:199-210を参照のこと)またはそれらの活性フラグメント（例えば、p110RB

、p56RB)を含むが、特に好ましい付加的抗癌剤(化合物)は、パクリタキセル誘導体(例えば、アナログ)のようなパクリタキセル様活性を有するパクリタキセルおよび化合物を含む。

腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドと細胞を接触させることが、転移性細胞を阻害し得ることもまた、本発明の発見であった。このような阻害は、転移性細胞の形成、増殖、移動、または再産生の阻害の形態をとり得る。1つの実施態様において、阻害は、一次腫瘍から遠くでの新生物の出現における阻害(例えば、減少および／または除去)によって特徴付けられ得る。従って、本発明は、転移性疾患の進行を処置(緩和または排除)するための方法を提供する。本発明は、転移性細胞を、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドと接触させる工程を包含する。特に好ましい実施態様において、本発明は、外科的創傷部位における細胞(例えば、腫瘍塊の除去またはデバルキング(debulking)後)を、腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドと、付加的抗癌剤と組み合わせて接触させる工程を包含し得る。細胞はさらに、本明細書中に記載のような付加抗癌剤と接触され得る。

さらに別の実施態様において、本発明は、腫瘍抑制遺伝子および遺伝子産物を利用する有利な処置レジメを提供する。一部には、これらの処置レジメは、腫瘍核酸および／またはポリペプチドが、単回ボースにおいてではなく複数回の投与で送達される場合、細胞または腫瘍成長を阻害することにおいてより有効であるという驚くべき発見に基づく。

腫瘍サプレッサーおよび付加的抗癌剤が投与される順番は、本発明に重要ではない。従って、組成物は、同時または連続的に投与され得る。例えば、1つの実施態様において、少なくとも1つの付加抗癌剤(単独または化学治療剤と組み合わせて)での細胞の前処置は、引き続いて投与される腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドの効力を増大させる。1つの実施態様において、化学治療剤は、付加的抗癌剤ならびに腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドの前に投与される。別の実施態様において、付加的抗癌剤(単独または化学治療剤と組み合わせて)は、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドと同時に投与される。さらな

る実施態様において、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドは、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドのアーム後に投与される。

組成物を投与する工程および本発明の方法の抗腫瘍効果はまた、抗腫瘍非特異的效果、いわゆる「傍観者(bystander)効果」を含む(例えば、Zhang (1996) Cancer Metastasis Rev. 15:385-401およびOkada (1996) Gene Ther. 3:957-96を参照のこと)。さらに、免疫系もまた、免疫系の体液性アーム(arm)または細胞性アームを選択的に強調する(または減弱する)ように、すなわち、B細胞および／またはT細胞(例えば、細胞傷害性リンパ球(CTL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL))応答を調節するように操作され得る。例えば、TIL(表現型的には、ヘルパーT細胞、CD3+、およびCD4+)における増加は、p53発現アデノウイルスのヒトへの投与の際に観察される。詳細には、TILにおける増加は、以下に詳細に記載されるように、転移性肝癌の処置のための、p53発現アデノウイルスの肝動脈内投与の際に観察される。

本発明の方法は、単一の付加的抗癌剤の使用、または単一の化学治療剤の使用にすら制限されないことが認識される。従って、本発明は、細胞または腫瘍を、本明細書中に記載の腫瘍抑制核酸および1つ以上の付加的抗癌剤と接触させることによって、内因性腫瘍抑制タンパク質を欠く疾患哺乳動物細胞またはそのよう

な細胞を含む腫瘍を阻害する方法を提供する。

## I. 付加的抗癌剤

### A) 微小管に影響する薬剤

先に説明したように、1つの実施態様において、本発明は、細胞を、微小管に影響する薬剤(例えば、パクリタキセル、パクリタキセル誘導体、またはパクリタキセル様化合物)のような腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸および付加的抗癌剤と接触させることによって、内因性腫瘍抑制タンパク質を欠く疾患細胞を阻害する方法を提供する。本明細書中で使用する微小管に影響する薬剤は、微小管形成および／または作用に影響を及ぼすことによって、細胞性有糸分裂を阻害する(すなわち、抗有糸分裂効果を有する)化合物である。そのような薬剤は、例えば、微小管形成を中断させる微小管を安定化する薬剤であり得る。

本発明において有用な微小管に影響する薬剤は、当業者に周知であり、そしてアロコルヒチン(NSC 406042)、Halichondrin B(NSC 609395)、コルヒチン(NSC 757)、コルヒチン誘導体(例えば、NSC 33410)、ドラスタチン10(NSC 376128)、メイタンシン(NSC 153858)、リゾキシシン(NSC 332598)、パクリタキセル

(タキソール®、NSC 125973)、タキソール®誘導体(例えば、NSC 608832)、チオ

コルヒチン(NSC 361792)、トリチルシステイン(NSC 83265)、硫酸ビンブラスチン(NSC 49842)、硫酸ピンクリスチン(NSC 67574)、エポチロンA、エポチロン、およびディスコダーモリド(discodermolide)(Service, (1996) Science, 274:2009を参照のこと)エストラムスチン、ノコダゾール、MAP4などを含むが、これらに限定されない。そのような薬剤の例はまた、科学文献および特許文献に記載される(例えば、Bulinski (1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou (1997) Nature 387:268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell 8:973-985; Panda (1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812を参照のこと)。

特に好ましい薬剤は、パクリタキセル様活性を有する化合物である。これらは、パクリタキセルならびにパクリタキセル誘導体(パクリタキセル様化合物)および

び類似体を含むが、これらに限定されない。パクリタキセルおよびその誘導体は、市販されている。さらに、パクリタキセルならびにパクリタキセル誘導体および類似体を作製する方法は、当該分野において周知である(例えば、米国特許第5,569,729号; 同第5,565,478号; 同第5,530,020号; 同第5,527,924号; 同第5,508,447号; 同第5,489,589号; 同第5,488,116号; 同第5,484,809号; 同第5,478,854号; 同第5,478,736号; 同第5,475,120号; 同第5,468,769号; 同第5,461,169号; 同第5,440,057号; 同第5,422,364号; 同第5,411,984号; 同第5,405,972号; および同第5,296,506号を参照のこと)。

さらなる微小管に影響する薬剤は、当該分野で公知の多くのこのようなアッセイの1つ(例えば、パクリタキセルアナログのチューブリン重合(tubulin-polym

erizing) 活性を測定する、細胞の有糸分裂をブロックするこれらの化合物の潜在性を測定する細胞アッセイと組み合わせた半自動化アッセイ) を用いて評価され得る (Lopes(1997)Cancer Chemother.Pharmacol. 41:37-47を参照のこと)。

一般的に、試験化合物の活性は、細胞を化合物と接触させることにより、そして細胞周期が(特に、有糸分裂の事象の阻害を介して)破壊されるか否かを決定することにより決定される。このような阻害は、分裂装置の破壊(例えば、通常の紡錘体形成の破壊)により媒介され得る。有糸分裂が中断された細胞は変化した形態(例えば、微小管の緊密化、染色体数の増加など)により特徴付けられ得る。

好ましい実施態様において、可能なチューブリン重合活性を有する化合物がインビトロスクリーニングされる。好ましい実施態様において、化合物は、培養したWR21細胞(69-2 wap-ras系マウス由来)に対して、増殖阻害および/または細胞形態の変化、特に微小管の緊密化についてスクリーニングされる。次いで、ポジティブな試験化合物のインビトロスクリーニングは、WR21腫瘍細胞を保有するヌードマウスを用いて行われ得る。このスクリーニング方法についての詳細なプロトコルは、Porter (1995) Lab.Anim.Sci.,45(2):145-150により記載されている。

所望の活性について化合物をスクリーニングする他の方法は、当業者に周知である。代表的には、このようなアッセイは、微小管の組立および/または分解の阻害についてのアッセイを包含する。微小管の組立についてのアッセイは、例え

ば、Gaskinら、(1974) J.Molec. Biol.,89:737-758により記載されている。米国特許第5569,720号はまた、パクリタキセル様活性を有する化合物についてのインビトロアッセイおよびインビボアッセイを提供する。

#### B) ポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビター

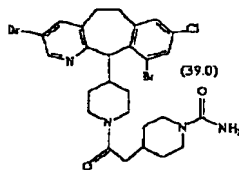
さらに別の実施態様において、本発明は、腫瘍抑制核酸および/または腫瘍抑制ペプチドならびにポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターの複合使用を提供する。特に好ましいポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターは、ファルネシルタンパク質(farnesyl-protein)トランスフェラ



ーゼ (FTP) インヒビター、ゲラニルゲラニルタンパク質 (geranylgeranyl-protein) トランスフェラーゼインヒビターおよび他のモノテルペンタンパク質トランスフェラーゼを含むがこれらには限られない。ポリプレニルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターである化合物の例は、科学文献および特許印刷物において周知であり、例えば、Zhang (1997) J. Biol. Chem. 272:10232-10239; Njoroge (1997) J. Med. Chem. 40:4290-4301; Mallams (1997) Bioorg. Med. Chem. 5:93-99 を参照のこと。

ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターである例示的な化合物は、以下に与えられる：

「FTP39」と命名されたFTPインヒビターは、1996年12月19日に出願された国際特許出願WO 97/23478に記載される。ここで、FTP39は、化合物「39.0」と命名される。WO 97/23478の95頁を参照のこと。



化合物 FPT39：

以下に記載のように、FTP39が、前立腺腫瘍細胞および乳腺腫瘍細胞に対して、本発明のp53発現アデノウイルスを用いる組み合わせの治療において使用される場合、この組み合わせは、どちらかの因子を単独で使用するよりも腫瘍細胞殺傷においてより効果的である。

オリゴペプチド（ほとんどはテトラペプチドであるがペンタペプチド（構造式、Cys-Xaa1-Xaa2-Xaa3）も含まれる）：EPA461,489; EPA 520,823; EPA 528,486; およびWO 95/11917)

ペプチド模倣化合物、特にCys-Xaa-Xaa-Xaa模倣物：EPA 535,730、EPA 535,731、EPA 618,221; WO 94/09766; WO 94/10138; WO 94/07966; 米国特許第5,326,773号、米国特許第5,340,828号; 米国特許第5,420,245号、WO 95/20396、米国特許第5,439,918号; およびWO 95/20396。

ファルネシル化ペプチド模倣化合物、特にファルネシル化されたCys-Xaa-Xaa-Xaa模倣物：GB-A2,276,618。

他のペプチド模倣化合物は：米国特許第5,352,705号、WO 94/00419;WO 95/00497;WO 95/09000;WO 95/09001;WO 91/12612;WO 95/25086;EPA 675,112およびFR-A 2,718,149。

縮合環三環系ベンゾシクロヘプタピリジン：WO 95/10514;WO 95/10515;WO 95/10516;WO 96/30363;WO 96/30018;WO96/30017;WO 96/30362;WO 96/31111;WO 96/31478;WO 96/31477;WO 9631505;国際特許出願第PCT/US96/19603号、WO 97/23478;米国特許出願第08/728104号、米国特許出願第08/712,989号、米国特許出願第08/713,326号、米国特許出願第08/713,908号、米国特許出願第08/713,705号、米国特許出願第08/713,703号、米国特許出願第08/710,225号、米国特許出願第08/711,925号、米国特許出願第08/712,924号、米国特許出願第08/713,323号;および米国特許出願第08/713,297号。

ファルネシル誘導体：EPA 534,546;WO 94/19357;WO 95/08546,EPA 537,007;およびWO 95/13509。

天然生成物および誘導体：WO 94/18157;米国特許出願第5,430,055;GB-A 2,261,373、GB-A 2,261,374、GB-A 2,261,375;米国特許出願第5,420,334号、米国特許出願第5,436,263号。

他の化合物：WO 94/26723;WO 95/08542;米国特許出願第5,420,157号;WO 95/21815;およびWO 96/31501。

#### C) 抗脈管形成化合物

本発明の腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸はまた、抗脈管形成化合物と

の結合により投与される。好ましい抗脈管形成組成物は、血管の形成および増殖を阻害し、より好ましくは血管の腫瘍への形成および/または増殖を阻害する。

適切な抗脈管形成組成物は、Galardin (GM6001,Glycomed,Inc.,Alameda,CA) 内皮応答インヒビター (例えば、インターフェロン $\alpha$ 、TNP-470および血管内皮成長因子のインヒビター)、細胞マトリックスの分解を促進する因子 (例えば、ビタキシン (ヒトLM-609抗体、Ixsys Co.,San Diego,CA;Metastat,ColllaGenex,

Newtown, PA: および Marimastat BB2156, British Biotech) および血管成長に直接的に作用する因子 (例えば、グループAの連鎖球菌抗原の外毒素由来であり、そして激しい宿主炎症性応答を誘導する新血管に結合するCM-101; およびサリドマイド) を含むがこれらには限られない。

ステロイドの数種はまた、抗脈管形成活性を発揮することが注目されている。特にいくつかの報告は、メドロキシプロゲステロンアセテート (medroxyprogesterone acetate) (MPA) (合成プロゲステロン) がウサギ角膜アッセイにおいて新血管新生を強力に阻害することを示した (Oikawa (1988) Cancer Lett. 43:85)。5-FUのプロドラッグである5'-デオキシ-5-フルオロウリジン (5'DFUR) が、抗脈管形成化合物として特徴付けられ得るのは、5'DFURがPD-ECGF/TPのチミジンホスホリラーゼ活性により5-FUに変換されるからである。5'DFURは、高い抗脈管形成能力を有するPD-ECGF/TPポジティブ腫瘍細胞について選択的に活性であり得る。最近の臨床研究は、5'DFURが、PD-ECGF/TPポジティブ腫瘍に有効であると考えられることを示した。5'DFURの抗腫瘍効果の激的な増加が、トランスフェクトされていない野生型細胞と比較してPD-ECGF/TPトランスフェクト細胞に現れることが示された (Haraguchi (1993) Cancer Res. 53:5680-5682)。さらに、結合された5'DFUR+MPA化合物はまた、有効な抗脈管形成剤である (Yayoi (1994) Int J Oncol. 5:27-32)。5'DFUR+MPAの組み合わせは異なるスペクトルを有する2つの抗脈管形成インヒビター、内皮成長因子のインヒビターおよびプロテアーゼインヒビターの組み合わせとして分類され得る。さらに、DMBA誘導性ラット乳癌を用いたインビボ実験において、5'DFURは、AGM-1470との組み合わせ効果を示した (Yamamoto (1995) Oncol Reports 2:793-796)。

本発明の使用のための抗脈管形成化合物の別の群には、新脈管形成を促進する

ヘパリン結合成長因子の機能を妨げ得る多糖 (例えば、多硫酸ペントサン (pentosan polysulfate)) が挙げられる。

新脈管形成の他の調節剤には、血小板因子IV、およびAGM1470が挙げられる。さらに他の調節剤には、天然原料のコラゲナーゼインヒビター由来であるビタミンD3-アナログ、フミガリン (fumigallin)、ヘルビマイシン (herbimycin) A

およびイソフラボンが挙げられる。

#### D) 内分泌治療

すでに確立され、そして代表的な細胞分裂抑制処置である内分泌治療は、ホルモン依存性細胞を静止状態にし得、そしてインビボにおいて腫瘍細胞数を減少させ得、そしてホルモン依存性の腫瘍を有する患者において腫瘍成長を阻害し得る。このような治療には、過剰増殖細胞の処置において腫瘍サプレッサーの効果を増大させると期待される。従って、別の実施態様において、本発明は、例えば、腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドならびに抗エストロゲン、抗アンドロゲンあるいは抗プロゲステロンの併用使用を提供する。当業者に周知の内分泌治療には、タモキシフェン、トレミフェン（例えば、米国特許第4,696,949号参照のこと）、フルタミド（flutamide）、メガーゼ（megase）、およびルプロン（lupron）（例えば、WO 91/00732、WO 93/10741、WO 96/26201、およびGauthierら、J. Med. Chem. 40:2117-2122(1997)をまた参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### E) 付加的抗癌剤の送達：薬学的組成物

##### 組成物

##### 薬学的組成物

本発明の方法に用いられる付加的抗癌剤は、代表的には薬学的に受容可能なキャリア（賦形剤）と組み合わせられ、薬学的組成物を形成する。本発明の薬学的組成物は、腫瘍抑制遺伝子または腫瘍抑制ポリペプチド（例えば、p53またはRB）を有するかまたは有さない1つ以上の付加的抗癌剤を含み得る。

薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、組成物を安定化するため、あるいは因子および／または薬学的組成物の吸収を増加または減少させるために作用する生理学的に受容可能な化合物を含み得る。生理学的に受容可能な化合物には、例

えば、グルコース、スクロース、またはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質、付加的抗癌剤のクリアランスもしくは加水分解を減少させる組成物または賦形剤を含むか、または他の安定化剤および／または緩衝剤を含み得る。洗浄剤は

また、組成物を安定化するために使用されるか、または薬学的組成物の吸収を増加させるかもしくは減少させるために使用される（以下の例示的界面活性剤を参照のこと）。

他の生理学的に受容可能な化合物には、湿潤剤、乳化剤、分散剤または微生物の成長または活動を阻止するのに特に有用な保存剤が挙げられる。種々の保存剤は、周知であり、例えばフェノールおよびアスコルビン酸を含む。当業者は、生理学的に受容可能な化合物を含む薬学的に受容可能なキャリアの選択が、例えば、付加的抗癌剤の投与経路、および特に付加的抗癌剤の特定の生理-化学的な特徴に依存することを理解する。

投与のための組成物は、一般に、薬学的に受容可能なキャリア、好ましくは水溶性付加的抗癌剤のための水性キャリアに溶解された付加的抗癌剤の溶液を含む。種々のキャリアが使用され得、これは、例えば緩衝化生理食塩水などである。これらの溶液は、無菌であり、そして一般的に望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術により滅菌される。組成物は、pH調整剤および緩衝化剤のように生理学的な状態に近づけるために必要とされる薬学的に受容可能な補助的物質、毒性調節剤など（例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど）を含み得る。これらの処方物中の付加的抗癌剤の濃度は、大きく変化する得、そして主に、選択された特定の投与様式および患者の必要性に従って液量、粘度、体重などに基づいて選択される。

#### 送達経路

本発明の方法において使用される付加的抗癌剤は有用であり、そして当該分野で公知の任意の手段（例えば全身的、領域的にまたは局所的に；静脈内、腫瘍内、静脈内（IV）、非経口、胸腔内、局部的、経口的に、あるいは皮下、気管内（例えば、エアロゾルによる）のような局所投与、または経粘膜（transmucosal）

（例えば、口腔、膀胱、膣、子宮、直腸、鼻粘膜）、腫瘍内（例えば、経皮的適用または局所注射）により単独、または薬学的組成物（p53のような腫瘍サブレッツサーを有するか、または有さない）として送達され得る。特に好ましい投

与態様には、特に、例えば特定の器官（例えば、脳、肝臓、脾臓、肺）に集中させるために「領域的な効果」を有することが所望される場合、動脈内注射が含まれる。例えば、肝臓内動脈注射は、抗腫瘍の領域的な効果が肝臓において所望される場合に好まれ；または頸動脈内注射は、組成物を脳（例えば、脳腫瘍の処置のために）、頸動脈または動脈系の頸動脈（例えば、後頭部の動脈（occipital artery）、耳介動脈（auricular artery）、側頭部の動脈（temporal artery）、大脳動脈（cerebral artery）、顎動脈（maxillary artery）など）への送達が所望される場合に好まれる。

バクリタキセルおよび特定のバクリタキセル誘導体は、水溶液中にわずかにのみ溶解する。好ましい実施態様において、これらの組成物は、腫瘍部位へ直接送達されるか（例えば、注射、路通（canalization）、または外科手順中の直接的な適用により）または受容可能な賦形剤中で可溶化される。バクリタキセルおよびバクリタキセル誘導体を投与する方法は、当業者に周知である（例えば、米国特許第5,583,153号、同第5,565,478号、同第5,469,804号、同第45,484,809号を参照のこと）。他のバクリタキセル誘導体は、水溶性アナログおよび／またはプロドラッグであり（米国特許第5,411,984号および同第5,422,364号を参照のこと）、そして上記のような任意の種々の方法により、都合よく投与される。

本発明の薬学的組成物は、局所的な投与に（例えば、初期腫瘍、腫瘍性細胞、転移性細胞、およびそれらの前駆体を処置するための外科的創傷において）特に有用である。別の実施態様において組成物は、静脈内投与または身体の窩洞もしくはは器官の管腔への投与のような非経口投与に有用である。

#### 処置レジメ

薬学的組成物は、投与方法に依存する種々の単位投薬量形態で投与され得る。例えば、経口投与に適した単位投薬量形態には、粉末、錠剤、丸剤、カプセル剤、およびトローチ剤が挙げられる。経口的に投与される場合、付加的抗癌化合物（例えば、バクリタキセルおよび記載の関連化合物）は消化から保護されなければ

ならないことが認識される。これは、代表的には、付加的抗癌剤と酸加水分解および酵素加水分解に対する抵抗性を付与する組成物との複合体形成すること、

またはリポソームのような適切な抵抗性キャリアで付加的抗癌剤をパッケージングすることのいずれかにより達成される。消化から化合物を保護する手段は、当該分野に周知である（例えば、治療剤の経口的な送達のための脂質組成物を記載している米国特許第5,391,377号を参照のこと）。

代表的な化学療法剤についての投薬量は、当業者に周知である。さらに、このような投薬量は、代表的には本質的に助言的なものであり、そして特定の治療状況、患者の許容度などに依存して調整され得る。従って、例えば、代表的な薬学組成物（例えばパクリタキセル）の、静脈内投与（IV）についての投薬量は、1～24時間（代表的には、1、3または6時間、より好ましくは3時間）にわたり約135mg/m<sup>2</sup>投与され、そしてより好ましくは、3週間毎に3～6サイクル繰り返される。過敏反応の頻度および重度を減少させるために、患者はまた、約20mgのデキサメタゾン（デカドロン(Decadron)、および他）を経口的に、約12時間および

6

時間前に受け、そして約50mgのジフェンヒドラミン（ベナドリル(Benadryl)®、および他）および約300mgのシメチジン（タガメット(Tagamet)®）または50mgのランチジン（ザンタック(Zantac)®）静脈内投与を、パクリタキセルの処置前の3

0～60分間受ける。かなり高い投薬量（例えば、1日あたり約350mg/m<sup>2</sup>までの範囲）が、特に薬物が隔離された部位へ投与される場合、および血流へ投与されない（例えば、身体の窩洞または器官の管腔への投与）場合に使用され得る。実質的により高い投薬量が、例えば、局所的な投与のように選択された任意の経路により可能である。非経口的に投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に周知または明らかであり、そして以下のような刊行物により詳細に記載されている。RemingtonのPharmaceutical Science, 15版、Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980)および米国特許出願第5,583,153号、同第5,565,478号、同第5,496,804号および同第5,484,809号。代表的な投薬量は、例えば、腹腔内投与について、1週間に20～150mg/m<sup>2</sup>、または3週間毎に約250mg/m<sup>2</sup>である。

付加的抗癌剤を含む組成物は、治療処置のために投与され得る。治療適用にお

いて、組成物は1つ以上の細胞型の過剰増殖により特徴づけられる疾患を病む患者に対して、その疾患および／またはその合併症を治癒または少なくとも部分的に静止させるのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的な有効な投薬量」として規定される。この使用に有効な量は、疾患の重度および一般的な患者の健康状態に依存して投与され得る。

組成物の単一の投与かまたは複数の投与かは、患者により必要とされそして許容される投薬量および回数に依存する。いずれにしても、組成物は、本発明の付加的抗癌剤が患者を効果的に処置するのに十分な量を提供すべきである。

#### I I. 腫瘍抑制遺伝子および遺伝子産物

##### A) 好ましい公知の腫瘍サプレッサー

上記に説明したように、1つの実施態様において、本発明は細胞を腫瘍抑制核酸および付加的抗癌剤（例えば、パクリタキセル、パクリタキセルの誘導体またはパクリタキセル様の化合物）と接触させることにより、細胞の成長および／または増殖を阻害する方法を提供する。

腫瘍抑制遺伝子は、当業者に周知であり、そしてこれにはRB、p53、APC、FHIT（例えば、Siprashvili(1997)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 94:13771-13776を参照のこと）、BRCA1およびBRCA2、VHL、WT、DCC、FAP、NF、MEN、E-cadherin、nm23、MMACIおよびPTCが挙げられるが、これらには限られない。RB遺伝子または網膜芽腫の遺伝子は原型腫瘍サプレッサーであり、そして（例えば、Bockstein (1990) Science 247:712-715, Benedict(1980)Cancer Invest.,8:535-540, Riley(1990)Ann.Rev.Cell Biol. 10-1-29, およびWienberg(1992)Science 254:1138-1146）に詳細に特徴付けられている。おそらく最も特徴付けられている腫瘍サプレッサーはp53であり、これは多くの新生組織腫（neoblastoma）ならびにリー-フラウメニ（Li-Fraumeni）症候群を有する家系における多様な腫瘍の発生に対する遺伝的性質に関係する（例えば、Wills(1994)Hum.Gene Therap.5:1079-1088、米国特許出願5,532,220、WO 95/289048、およびHarris(1996)J.Nat.Canc. Inst.88(20):1442（遺伝子治療におけるp53のクローニング発現および使用を記載）を参照のこと）。他の腫瘍サプレッサーには、ウィルムス腫瘍の特徴があるWT（すなわち、11p13ではWT1）遺伝子が挙げられる（Callら、(1990)Cell,60:509-520,G



esseler(1990)Nature 343:774-778、およびRoseら、(1990)Cell,60,495-508を参照のこと)。Fragile Histidine Triadについて、FHITと呼ばれる腫瘍抑制遺伝子は、特に転座、切断しやすいことで公知の染色体3 (3p21ではまた、3p14.2として報告)上の領域に見出され、そしてギャップは食道癌、胃癌および大腸癌を導くと考えられている(例えば、Ohtaら、(1996)Cell,84:587-597,Genbank登録番号U469227を参照のこと)。腫瘍抑制遺伝子DCC (18q21) およびFAPは大腸癌に関連する(例えば、Hedrickら、(1994)Genes Dev.,8(10):1174-1183,DCCについてのGenbank登録番号X76132、およびFAPについてのWienberg(1992)Science,254:1138-1146を参照のこと)。NF腫瘍抑制サプレッサー (17q11ではNF1そして22q12ではNF2)は、神経性腫瘍に関連する(例えば、NF1についての神経線維腫症は、例えば、Caivthonら、(1990)Cell,62:193-201、Viskochilら、(1990)Cell,62:187-192、Wallanceら、(1990)Science,249:181-186、およびXugら、(1990)Cell,62:599-608;ならびにNF2についての骨膜腫 (manugoma) およびシュエワン腫 (schwannoma) を参照のこと) MEN腫瘍抑制サプレッサーは、多発性内分泌腺腫症候群 (multiple endocrine neoplasia syndrome) の腫瘍に関連する (Wienberg Science,254:1138-1146、およびMarshall(1991)Cell,64:313-326を参照のこと)。VHL腫瘍抑制サプレッサーはフォン・ヒッペル-リンドウ (von Hippel-Landau) 症候群に関連する (Latif(1993)Science 260:1317-1320、GenBank登録番号L15409を参照のこと)。

。広く発表されたBRCA1遺伝子およびBRCA2遺伝子は乳癌に関連する(例えば、Skolnick(1994)Science, 266:66-71, BRCA1についてのGenBank登録番号U14680、およびTeng(1996)Nature Genet.13:241-244、GenBank登録番号U43746を参照のこと)。さらにE-cadherinは浸潤表現型の前立腺癌に関連する (Umbas(1992)Cancer Res.52:5104-5109、Bussemakes(1992)CancerRes. 52:2916-2999,GenBank登録番号272397を参照のこと)。NM23遺伝子は腫瘍転移に関連する (Dooley(1994)Hum. Genet.,93(1):63-66、GenBank登録番号X75598を参照のこと)。他の腫瘍抑制サプレッサーには、膵臓癌に関連するDPC4 (18q21で同定)、大腸癌に関連するhLM1 (3p)およびhMSH2(2p)、ならびに黒色腫、膵臓癌および食道癌に関連するCDKN2(p16)および(9p)が挙げられる。最後に、ヒトPCT遺伝子(キイロショウジョウバ

エのパッチ (ptc) 遺伝子のホモログ) は、母斑様基底細胞癌症候群 (nevoid basal cell carcinoma syndrome) (NBCSS) および体細胞性基底細胞癌に関連する (例えば、Hannら、(1996) Cell, 85:841-851を参照のこと)。腫瘍サプレッサーについてのこの列挙は、網羅的でなく、そして制限を意図するものでもなく、単に広範な種々の公知の腫瘍サプレッサーを例示するために意味される。

B) 以前には未知の腫瘍サプレッサーの同定およびスクリーニング

腫瘍抑制遺伝子についての同定方法またはアッセイ方法は、当業者に公知である。代表的には、過剰増殖性細胞は過剰増殖状態に関連する (相関する) 遺伝子の喪失または変異についてスクリーニングされる。腫瘍抑制遺伝子 (TSG) として定量するための遺伝子についての最もストリンジェントな試験は、腫瘍または腫瘍由来の細胞の発癌性表現型を抑制する遺伝子の能力である。腫瘍抑制核酸は、好ましくは、適切な発現ベクターにおいてクローニングされたcDNAとして腫瘍細胞に導入されるか、または候補体腫瘍抑制遺伝子を保有する個々の染色体はマイクロセルトランスファー (microcell transfer) 技術により腫瘍細胞へ導入される。あるいは、腫瘍抑制遺伝子産物 (例えば、腫瘍抑制ポリペプチド) は、細胞に導入され、そして細胞の増殖速度が (例えば、細胞計測または腫瘍体積の測定などにより) 測定される。増殖の完全または部分的な阻害 (例えば、増殖速度の低下)、接触阻害、浸潤表現型の喪失、細胞分化、およびアポトーシスは全て、発癌表現型の抑制の指標 (腫瘍状態に対する感受性の減少) である。

変化されたまたは過小発現された核酸を同定するための腫瘍スクリーニング方法は当業者に周知である。このような方法には、サブトラクティブなハイブリダイゼーション (例えば、Hamson(1992) Nucleic Acid Res. 20:2899を参照のこと)、比較 (comparative) ゲノムハイブリダイゼーション ((CGH) 例えば、WO 93/18186、Kallioiemi(1992) Science, 258:818を参照のこと) および核酸プローブの高密度アレイを用いる発現モニタリング (例えば、Lockhart(1996) Nature Biotechnology, 14(13):1675-1680を参照のこと) が挙げられるが、これらには限られない。

C) p53および他の腫瘍サプレッサーの調製

上記に示したように、本発明は、細胞（例えば、インビトロ、生理学的溶液（例えば血液）、組織器官中）または生物を、腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制遺伝

子産物（例えば、ポリペプチド）と接触させることに関する。腫瘍抑制核酸または腫瘍抑制ポリペプチドは、任意の公知腫瘍サプレッサー（上記のRB、p53、h-NUC（Chen(1995)前出）、APC、FHIT、BRCA1、BRCA2、VHL、WT、DCC、FAP、NF、MEN、E-cadherin、nm23、MMACIおよびPTCを含むが、これらには限定されない）の核酸またはポリペプチドであり得る。好ましい実施態様において、腫瘍サプレッサーは、RB核酸もしくはRBポリペプチドまたはp53核酸またはp53ポリペプチドまたはそれらの活性フラグメントである。

最も好ましい実施態様において、p53抑制核酸またはRB腫瘍抑制核酸は、標的（例えば、腫瘍）細胞に位置された場合に、腫瘍抑制遺伝子または腫瘍抑制cDNAを発現するプロモーターの制御下で発現カセット中に存在する。発現カセットおよび／または腫瘍抑制遺伝子をコードするベクターを構築する方法は、以下に記載されるように当業者に周知である。

#### 1. 腫瘍抑制核酸の調製

本発明の腫瘍抑制タンパク質またはタンパク質部分配列をコードするDNAは、任意の適切な方法、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限または直接的な化学的合成（上記に示される配列情報の存在を用いる）ホスホトリエステル法（Narang(1979)Meth. Enzymol. 68:90-99）により；ホスホジエステル法（Brownら、Meth.Enzymol.68:109-151(1979)）；ジエチルホスホルアミダイト法（Beaucageら、Tetra.Lett.,22:1859-1862(1981)）；ならびに固体支持（solid support）法（米国特許第4,458,066）により調製され得る。

化学的合成は、1本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、相補的な配列を用いたハイブリダイゼーションにより、または鋳型として1本鎖を用いるDNAポリメラーゼを用いたポリメリゼーション（重合）により2本鎖DNAに変換され得る。当業者は、DNAの化学的合成は約100塩基の配列に制限されるが、より長い配列が、より短い配列の連結により得ることが可能であることを認識する。

あるいは、部分配列は、クローン化され得、そして適切な制限酵素を使用して

切断される適切な部分配列であり得る。次いで、フラグメントは、所望のDNA配列を産生するために連結され得る。

1つの好ましい実施態様において、本発明の腫瘍抑制核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のようなDNA増幅方法を使用してクローン化され得る。従って、例えば、核酸配列または部分配列は、1つの制限部位(例えば、NdeI)を含むセンスプライマーおよび別の制限部位(例えば、HindIII)を含むアンチセンスプライマーを使用して、PCR増幅される。これは、所望の腫瘍抑制配列または部分配列をコードし、そして末端制限部位を有する核酸を生ずる。次いで、この核酸は第2分子をコードする核酸を含みそして適切な対応する制限部位を有するベクター中に、容易に連結され得る。適切なPCRプライマーは、任意の特定の公知の腫瘍抑制遺伝子、cDNA、またはタンパク質についての公表された配列情報を使用して当業者によって決定され得る。適切な制限部位はまた、部位特異的変異誘発によって、腫瘍抑制タンパク質またはタンパク質部分配列をコードする核酸に付加され得る。腫瘍抑制配列または部分配列を含むプラスミドは、適切な制限エンドヌクレアーゼで切断され、次いで標準的な方法に従って第2分子をコードするベクター中に連結される。

上記に示されるように、多くの腫瘍抑制遺伝子の核酸配列は公知である。従って、例えばp53の核酸配列は、Lambら(1986)Mol.Cell Biol. 6:1379-1385, Genbank登録番号:M13111)に見い出される。同様に、RBの核酸配列は、Leeら(1987)Nature, 329:642-645 (GenBank登録番号:M28419により記載される。他のサプレッサー抑制の核酸配列は、上記の第II(a)の章に示されるように利用可能である。利用可能な配列情報を使用して、当業者は、本発明における実施に適切なベクター中に、腫瘍抑制遺伝子をクローニングし得る。

p53およびRB腫瘍サプレッサーは、本発明の方法における使用のために特に好ましい。それぞれの腫瘍抑制タンパク質の発現、または遺伝子治療適用のために適切なベクター中へp53およびRBをクローニングする方法は、当該分野で周知である。従って、例えばp53のクローニングおよびp53の使用は、Wills(1994)、前出、; 米国特許第5,532,220号、1994年10月25日に出願された係属出願USSN 08/3

28,673、およびW095/11984によって詳細に記載されている。代表的な発現カセットは、プロモーター、より好ましくは強力なプロモーター（例えば、Ad2主要後期(Ad2 MLP)プロモーター、またはヒトサイトメガロウイルス最初期遺伝子プロモーター(CMV)へ作動可能に連結される腫瘍抑制cDNAとともに構築される。

特に好ましい実施態様において、プロモーターは、3部構成(tripartite)リーダーcDNAに続けられ、そして腫瘍抑制cDNAはポリアダニル化部位（例えば、E1bポリアダニル化部位）へと続く（例えば、係属出願USSN 08/328,673, W095/11984およびWills(1994)前出を参照のこと）。種々の組織特異的プロモーターもまた適切であることが理解される。従って、例えばチロシナーゼプロモーターは、メラノーマに対する発現を標的するために使用され得る（例えば、Siders (1996) Cancer Res. 56:5638-5646を参照のこと）。特に好ましい実施態様において、腫瘍抑制cDNAは、以下に記載されるように、遺伝子治療に適切なベクター中で発現され得る。

## 2. 腫瘍抑制タンパク質の調製

### a) 新規化学合成

腫瘍抑制ポリペプチドの公知の配列を使用して、腫瘍抑制タンパク質またはその部分配列は、標準的な化学ペプチド合成技術を使用して合成され得る。所望の部分配列が比較的短い場合（例えば、特定の抗原性決定因子が所望される場合）、分子は単一の連続ポリペプチドとして合成され得る。大きな分子が所望される場合、部分配列は（1つ以上のユニットにおいて）別々に合成され得、次いで1つの分子のアミノ末端の他の分子のカルボキシル末端との縮合によって融合され、それによってペプチド結合が形成される。

配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に接続し、続いて配列中に残るアミノ酸を連続的に付加する固相合成は、本発明のポリペプチドの化学合成のための好ましい方法である。固相合成のための技術は、BarayおよびMerrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis, The Peptides 3-284頁: Analysis, Synthesis, Biology. 第2巻: Special Methods in Peptide Synthesis, Parta., Merrifieldら, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156(1963), およびStewartら, Solid Phase Peptide

Synthesis、第2編Pierce Chem. Co., Rockford, III. (1984)によって記載されている。

#### b) 組換え発現

好ましい実施態様において、腫瘍抑制タンパク質またはその部分配列は、組換えDNA方法論を使用して合成される。一般に、これは、融合タンパク質をコード

するDNA配列を作製する工程、特定のプロモーターの制御下での発現カセットにDNAを設置する工程、宿主中のタンパク質を発現する工程、発現したタンパク質を単離し、そして必要ならば、タンパク質を再生する工程を含む。

腫瘍抑制核酸を特定のベクター中へクローニングする方法は上記される。腫瘍抑制タンパク質またはタンパク質部分配列をコードする核酸配列は、次いでE. coli、他の細菌宿主、酵母および種々の高等真核生物細胞（例えば、COS、CHO、HeLa細胞株およびメラノーマ細胞株）を含む種々の宿主細胞中で発現され得る。腫瘍抑制タンパク質は、代表的には真核生物中で見出されるので、真核生物宿主が好まれる。組換えタンパク質遺伝子は、各々の宿主のための適切な発現制御配列に作動可能に連結される。E. coliについては、これは、T7、trp、またはλプロモーターのようなプロモーター、リボソーム結合部位そして好ましくは転写終結シグナルを含む。真核細胞については、制御配列は、プロモーターおよび好ましくはイムノグロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスなどに由来するエンハサーならびにポリアデニル化配列を含み、そしてスプライスドナーおよびアクセプタードナー配列を含み得る。

本発明のプラスミドは、E. coliについては塩化カルシウム形質転換、および哺乳動物細胞についてはリン酸カルシウム処置またはエレクトロポレーションのような周知の方法によって選択された宿主細胞中へ形質導入され得る。プラスミドによって形質転換された細胞は、プラスミドについて含まれる遺伝子（例えば、amp、gpt、neoおよびhyg遺伝子）によって与えられる抗体に対する抵抗性によって選択され得る。

1度発現されると、組換え腫瘍抑制タンパク質は、硫酸アンモニウム沈澱、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当該

分野の標準的手順に従って精製され得る（一般的には、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutcher, Methods in Enzymology, 182巻:Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990)を参照のこと）。少なくとも約90～95%の同質性の実質的に純粋な組成物が好ましく、そして98～99%以上の同質性が最も好ましい。1度精製されると、部分的にまたは所望されるような同質性まで、次いでポリペプチドが使用され得る（例

えば、抗体産生のための免疫源として）。

当業者は、化学合成、生物学的発現または精製の後に、腫瘍抑制タンパク質が、構成ポリペプチドの天然のコンフィメーションとは実質的に異なるコンフォメーションを有し得ることを理解する。この場合、ポリペプチドを変性および還元すること、次いでポリペプチドを好ましいコンフォメーションへの再フォールディングさせることが必要であり得る。タンパク質を還元し、および変性し、ならびに再フォールディングを誘導する方法は、当業者に周知である(Debinaki (1993) J. Biol. Chem. 268:14065-14070;Kreitman (1993) Bioconjug. Chem. 4:581-585;およびBuchner (1992) Anal. Biochem. 265:263-270を参照のこと)。例えば、Debinski (1993) (前出)は、グアニジン-DTE中での封入体タンパク質の変性および還元を記載している。次いでこのタンパク質は、酸化グルタチオンおよびL-アルギニンを含むレドックス緩衝液中で再フォールディングされる。

当業者は、本明細書中に記載される多くの保存的変種の核酸およびポリペプチド配列が、機能的に同一な産物を産生することを理解する。例えば、遺伝子コードの縮重に起因して、「サイレントな置換」（すなわち、コードされるポリペプチド中に改変を生じない核酸配列の置換）は、アミノ酸をコードする全ての核酸配列の暗示される特徴である。同様に、アミノ酸配列における1つまたは数個のアミノ酸における「保存アミノ酸置換」は、高度な類似特性を有する異なるアミノ酸と置換（定義の章(前出)を参照のこと）され、また開示されるアミノ酸配列と、またはアミノ酸をコードする開示される核酸配列と高度に類似性であるように容易に同定される。このような保存的置換多様性の各々の明確に記載された配

列は、本発明の特徴である。

当業者は、改変が、それらの生物学的活性を漸減することなく腫瘍抑制タンパク質を作製し得ることを認識する。いくつかの改変は、融合タンパク質への標的分子のクローニング、発現または組込みを促進するように実施され得る。このような改変は当業者に周知であり、そして例えば、開始部位、または都合良く設置された制限部位または終結コドンまたは精製配列を産生するためのいずれかの末端に置かれる付加アミノ酸（例えば、ポリHis）を提供するためのアミノ末端に付加されたメチオニンを含む。

核酸およびポリペプチドのための改変は、所望される特徴付けのために適切なアッセイにおいて日常的なスクリーニング技術によって評価され得る。例えば、ポリペプチドの免疫学的な特徴における変化は、適切な免疫学的アッセイによって検出され得る。他の特性の改変（例えば、標的核酸との核酸ハイブリダイゼーション、タンパク質の酸化還元または熱安定性、疎水性、タンパク質分解のための感受性、または会合のための傾向）は全て標準的な技術に従ってアッセイされる。

#### D) 標的細胞への腫瘍サプレッサーの送達

本発明の方法において使用された腫瘍サプレッサーは、タンパク質としてまたは核酸としてのいずれかで細胞中に導入され得る。腫瘍サプレッサーがタンパク質として提供される場合、腫瘍抑制遺伝子発現産物（例えば、腫瘍抑制活性を有するp53およびRBペプチドまたはそのフラグメント）はタンパク質送達のための標準的方法を使用して標的細胞中へ導入される（以下の議論を参照のこと）。あるいは、腫瘍サプレッサーが腫瘍抑制核酸（例えば、遺伝子、cDNA、mRNAなど）である場合、核酸は細胞へ核酸を送達する従来の方法を使用して細胞内へ導入される。これらの方法は代表的には、以下に記載するようなインビボまたはエキソビボ遺伝子治療の送達方法を含む。p53またはRBを送達する特に好ましい方法は、脂質またはリポソーム送達および/またはレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターの使用を含む。

#### 1. インビボ遺伝子治療



より好ましい実施態様において、腫瘍抑制核酸（例えば、腫瘍抑制タンパク質をコードするcDNA）は、遺伝子治療ベクター（インビトロおよび/またはインビボにおいて細胞（例えば、ヒトまたは他の哺乳動物細胞）をトランスフェクトするためにコンピテントである）中へクローン化される。

インビボ、エキソビボ、およびインビトロで細胞へ核酸を導入するためのいくつかのアプローチが使用されている。これらは、脂質またはリボソームベースの遺伝子送達(WO 96/18372;WO 93/24640;Mannino (1988) BioTechniques 6(7):682-691;Rose, 米国特許第5,279,833号;WO 91/06309;およびFelgner (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84;7413-7414)およびレトロウイルスゲノムの一

部としてである治療用ポリヌクレオチド配列を保有する複製欠損レトロウイルスベクター(例えば、Miller (1990) Mol. Cell. Biol. 10:4239(1990);Kolberg (1992) J. NIH Res. 4:43およびCornetta (1991) Hum. Gene Ther. 2:215を参照のこと)を含む。

遺伝子治療手順の総説については、例えば、Zhang (1986) Cancer Metastasis Rev. 15:385-401;Anderson, Science (1992) 256:808-813;Nabel (1993) TIBTECH 11:211-217;Mitani (1993) TIBTECH 11:162-166;Mulligan (1993) Science, 926-932;Dillion (1993) TIBTECH 11:167-175;Miller (1992) Nature 357:455-460;Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10):1149-1154;Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36;Kremer (1995) British Medical Bulletin 51 (1) 31-44;Haddada (1995) 、 Current Topics in Microbiology and Immunology, DoerflerおよびBöhm (編) Springer-Verlag, Heidelberg Germany;およびYu (1994) Gene Therapy, 1:13-26を参照のこと。

icrobiology and Immunology, DoerflerおよびBöhm (編) Springer-Verlag, Heidelberg Germany;およびYu (1994) Gene Therapy, 1:13-26を参照のこと。

本発明の実施において有用なベクターは、代表的にはウイルスゲノム由来である。使用され得るベクターは組換え的に改変されたエンベロープ化または非エンベロープ化DNAおよびRNAウイルスを含み、好ましくは、バキュロウイルス科、バルボウイルス科、ピコルノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、アデノウイルス科またはピコルナウイルス科から選択される。各々の親ベクター特性の利点を利用するキメラベクターはまた、使用され得る(例えば、Feng

(1997) Nature Biotechnolgy 15:866-870を参照のこと)。このようなウイルスゲノムは、腫瘍抑制遺伝子を含むように組換えDNA技術によって改変され得、そして複製欠損、条件付き複製、または複製コンピテントであるように操作され得る。本発明の好ましい実施において、ベクターは複製欠損または条件付き複製である。好ましいベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびレトロウイルスゲノム由来である。本発明の最も好ましい実施において、ベクターはヒトアデノウイルスゲノム由来である複製非コンピテントベクターである。

条件付き複製ウイルスベクターは、不都合な広範な感染を回避するが特定の細胞型中の選択的発現を達成するために使用される。条件付き複製ベクターの例は、Bischoffら、(1996) Science 274:373-376; Pennisi, E. (1996) Science 274:342-343; Russell, S. J. (1994) Eur. J. of Cancer 30A(8):1165-1171中に記載されている。さらに、ウイルスゲノムは、特定の条件下でのみ導入遺伝子の複製または発現を達成する誘導プロモーターを含むように改変され得る。誘導プロモーターの例は、科学文献（例えば、YoshidaおよびHamada (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 230:426-430; Iidaら、(1996) J. Virol. 70(9):6054-6059; Hwangら、(1997) J. Virol 71(9):7128-7131; Leeら、(1997) Mol. Cell. Biol. 17(9):5097-5105; および Dreherら、(1997) J. Biol. Chem 272(46):29364-29371を参照のこと）において公知である。導入遺伝子はまた、特定の細胞型においてのみ導入遺伝子の発現を可能にする組織特異的プロモーター領域の制御下であり得る。

広く使用されるレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) およびその組み合わせを含む。例えば、Buchscher (1992) J. Virol. 66(5):2731-2739; Johann (1992) J. Virol. 66(5):1635-1640(1992); Sommerfelt (1990) Virol. 176:58-59; Wilson (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller (1991) J. Virol. 65:2220-2224; Wong-Staalら、PCT/US94/05700、および RosenbergおよびFauci (1993) Fundamental Immunology, 第3版Paul編、Raven Press

, Ltd., New Yorkおよびそれらの参考文献、ならびにYu (1994) 前出を参照のこと。ベクターは、必要に応じてこのベクターに対応するレトロウイルスによって感染されない細胞に対するベクターの宿主領域を拡張するように偽型にされる。水泡性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)は、造血管細胞を感染し得るVSV-G偽型HIVベクターを構築するために使用されている(Naldiniら、(1996) Science 272:263,およびAkkina (1996) J. Virol 70:2581)。

アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づくベクターはまた、標的核酸で細胞を形質導入するために使用される(例えば、インビトロにおける核酸およびペプチドの産生において、ならびにインビボおよびエキソビボにおける遺伝子治療手順において)。AAVベクターの概要に関しては、Okada (1996) Gene Ther. 3:957-964; West (1987) Virology 160:38-47; Carter (1989) 米国特許第4,797,368号; Carterら、WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801;

Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94:1351を参照のこと。組換えAAVベクターの構築は、Lebkowski、米国特許第5,173,414号; Tratschin (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin (1984) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081; Hermonat (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470; McLaughlin (1988) およびSamulski (1989) J. Virol., 63:03822-3828を含む多数の刊行物に記載される。rAAVによって形質転換され得る細胞株は、Lebkowski (1988) Mol. Cell. Biol., 8:3988-3996中に記載される細胞株を含む。他の適切なウイルスベクターはヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルスを含む。

特に好ましい実施態様において、腫瘍抑制遺伝子は遺伝子治療のために適切なアデノウイルスベクター中で発現される。インビボにおけるアデノウイルスベクターの使用、および遺伝子治療のためのアデノウイルスベクターの使用は、特許および科学文献中に詳細に記載される。例えば、Hermens (1997) J. Neurosci. Methods., Jan., 71(1):85-98; Zeiger (1996) Surgery 120:921-925; Channon (1996) Cardiovasc Res. 32:962-972; Huang (1996) Gene Ther. 3:980-987; Zepeda (1996) Gene Ther. 3 973-979; Yang (1996) Hum. Mol. Genet. 5:1703-1712; Caruso (1996) Proc. Natl Acad. Sci. USA 93:11302-11306; Rothmann (1996) Gen

e Ther. 3:919-926;Haecker (1996) Hum. Gene Ther. 7:1907-1914を参照のこと。  
。アデノウイルスベクターの使用はW0 96/25507中に詳細に記載されている。特に好ましいアデノウイルスベクターは、Wills (1994) 前出、同時係続のUSSN 08/328,673、およびW0 95/11984によって記載される。

特に好ましいアデノウイルスベクターは、いくつかのまたは全てのタンパク質IX遺伝子の欠失を含む。1つの実施態様において、アデノウイルスベクターはE1aおよび/またはE1b配列の欠失を含む。最も好ましい実施態様において、アデノウイルス構築物は、A/C/N/53またはA/M/N/53のようなp53をコードする構築物である（例えば、USSN 08/328,673、およびW0 95/11984を参照のこと）。

また、ヒトアデノウイルス2型または5型由来のベクターは好ましい。このようなベクターは、好ましくはE1aおよび/またはE1bコード領域中の改変または欠失による複製欠損である。特定の発現の特徴づけを達成するための、または反復投与またはより低い免疫応答を許容するためのウイルスゲノムへの他の改変が好

まれる。E4コード領域の完全なまたは部分的欠失を有し、必要に応じてE4 ORF6およびORF6/7を保持している組換えアデノウイルスベクターがより好ましい。E3コード配列は欠失され得るが、好ましくは保持される。特に、E3のプロモーターオペレーター領域が治療ベクターのためのより好ましい免疫学的プロフィールを達成するためにE3の発現を増加するように改変されることが好ましい。E4 ORF6およびORF6/7を保持するが、サイトメガロウイルスプロモーター領域制御下でp53をコードするDNA配列を含むヒトアデノウイルス5型ベクター、およびCMVプロモーターの制御下でE3を有し、E4コード領域の欠失を有する3部構成リーダー配列が最も好ましい。本明細書中に例示されるように本発明の最も好ましい実施において、ベクターはACN53である。

特に好ましい実施態様において、腫瘍抑制遺伝子はp53またはRBである。上記で説明されように、p53のクローニングおよび使用は、Wills (1994) 前出；1994年10月25日に出願された同時係属出願USSN 08/328,673およびW095/11984によって詳細に記載される。

## 2. エキソビド遺伝子治療

1つの実施態様において、本発明の方法は、被験体（例えば、ラット、マウス、ウシ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、ラマ(largomorph)、またはヒトを含む哺乳動物であるがこれらに限定されない）中の過剰増殖性（例えば、新生物性）細胞を阻止するために使用される。病理的過剰増殖性細胞は、グレーブズ病、乾癬、良性前立腺肥大、リー-フラウメニ症候群、乳癌、肉肺、膀胱癌、結腸癌、肺がん、種々の白血病およびリンパ腫、ならびに他の新生物を含むが、これらに限定されない疾患状態に特徴的である。

本発明の方法のエキソビゴ適用は、特に、病理学的過剰増殖性細胞の適切なサンプルを枯渇するための手段を提供する。従って、例えば、骨髓再構成の間の造血前駆体を夾雑している過剰増殖性細胞は本発明の方法のエキソビゴ適用によって排除され得る。代表的なこのような方法は被験体生物からサンプルを得ることを含む。サンプルは代表的には、表現型正常細胞および病原性（過剰増殖性）細胞の両方を含む異種細胞調製物である。サンプルは本発明の方法に従って、腫瘍抑制核酸またはタンパク質および付加抗癌剤と接触される。腫瘍抑制遺伝子は送

達され得る（例えば、レトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターのようなウイルスベクター）。処置は病原性細胞の増殖を減少させ、それによって高い比率の病原性細胞（被験体生物へ再導入され得る）に対する正常細胞を含むサンプルを提供する。

診断、研究のための、または遺伝子治療（例えば、宿主生物への形質転換細胞の再注入を介して）のためのエキソビゴ細胞形質転換は、当業者に周知である。好ましい実施態様において、細胞は被験体生物から単離され、本発明の腫瘍抑制遺伝子またはcDNAでトランスフェクトされ、そして被験体生物（例えば、患者）中へ再注入される。エキソビゴ形質転換のために適切な種々の細胞型は当業者に周知である。特に好ましい細胞は、前駆体細胞または幹細胞である（例えば、Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique第3版 Wiley-Liss, New York、および患者由来細胞をどのように単離するかそして培養するかに関する議論のための本明細書中で引用された参考文献を参照のこと）。形質転換細胞は当業者に周知の方法によって培養される。Kuchler (1997) Biochemic

al Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R.J., Dowden, Hutchins  
onおよびRoss, Inc.,ならびにAtlas(1993)CRC Handbook and Microbiological M  
edia (Parks編) CRC press, Boca Raton, FIもまた参照のこと。哺乳動物細胞系は  
しばしば、細胞の単層の形態であるが、哺乳動物細胞懸濁物もまた使用される。  
あるいは、細胞は、細胞バンク(cell bank) (例えば、血液バンク) 中に保存さ  
れる細胞に由来し得る。哺乳動物細胞株の例示的な例はHEC-1-B細胞株、VERO細  
胞およびHela細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、W138、BHK、Cos-  
7またはMDCK細胞株を含む(例えば、Freshney、前出を参照のこと)。

1つの特定の好ましい実施態様において、幹細胞は、細胞形質転換および遺伝  
子治療のためにエキソピボ手順で使用される。幹細胞を使用することの利点は、  
それらがインビトロにおける他の細胞型へ分化され得ることであるか、またはそ  
れらを骨髄中へ移植する哺乳動物(例えば、細胞のドナー)へ導入され得ること  
である。GM-CSF、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ のようなサイトカインを使用して、臨床的  
に有意な免疫細胞型へインビトロにて幹細胞(例えば、CD34<sup>+</sup>)を分化させるた  
めの方法は、公知である(例えば、Inaba (1992) J. Exp. Med. 176: 1693-170  
2; Szabolcs (1995) 154: 5851-5861を参照のこと)。

幹細胞を用いてではなく、T細胞またはB細胞はまたエキソピボ手順においてい  
くつかの実施態様において使用される。いくつかの技術がTおよびB細胞を単離す  
るために公知である。表面マーカーの発現はこのような細胞の同定および精製を  
容易にする。細胞の同定および単離の方法は、FACS、特定の細胞型と結合する固  
定された抗体とのフラスコ中でのインキュベーション、および磁気ビーズとのパ  
ニングを含む。

幹細胞は、公知の方法を使用して、形質導入および分化のために単離される。  
例えば、マウスにおいて、骨髄細胞はマウスを屠殺することによって、および1  
組のハサミで足骨を切断することによって、単離される。幹細胞は、好まれない  
細胞(例えば、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> (T細胞)、CD45<sup>+</sup> (panB細胞)、GR-1 (顆粒球)  
、およびIa<sup>d</sup> (分化した抗原提示細胞)、に結合する抗体で骨髄細胞をパニング  
することによって骨髄細胞から単離される。このプロトコルの例については、In

aba (1992) 前出を参照のこと。

ヒトにおいて、腸骨頂 (crest) からの骨髓吸引は、例えば、手術室において一般的な麻酔の下で行われる。骨髓吸引は、約1,000mlの量であり、そして後部腸骨および頂から回収される。回収された細胞の総数は、約  $2 \times 10^8$  /kg未満である場合、後部頂に加えて胸骨および前方腸骨頂を用いる第2の吸引が行われる。操作の間、照射されたバックされた赤血球が投与されて、吸引によって採取される髓の量と置換される。ヒト造血前駆体および幹細胞は、CD34表面膜抗原の存在によって特徴づけられる。この抗原は、例えば、CD34を結合するアフィニティーカラムにおける精製に使用される。骨髓が採取された後、単核細胞は、他の成分から、フィコール勾配遠心分離によって分離される。このことは、細胞分離器 (例えば、Baxter Fenwal CS3000+またはTerumo machine) を用いて半自動化法によって行われ得る。軽密度細胞 (ほとんど単核細胞から構成される) が回収され、そしてこの細胞は、プラスチックフラスコ中で、約37℃にて約1.5時間インキュベートされる。接着細胞 (単球、マクロファージ、およびB細胞) は、廃棄される。次いで、非接着細胞が回収され、そしてモノクローナル抗CD34抗体 (例えば、マウス抗体9C5) とともに、4℃にて30分間、緩やかに攪拌しながらイン

キュベートされる。抗CD34抗体についての最終濃度は、好ましくは約10  $\mu$ g/mlである。2回の洗浄の後、ヒツジ抗マウスIgG(Fc)抗体でコートされた常磁性ミクロスフェア (例えば、Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Californiaから供給されるDyna Beads) が、細胞懸濁液に、約2細胞/ビーズの比で添加される。約4℃にて約30分間のさらなるインキュベーション期間の後、常磁性ビーズを含むロゼット形成細胞は、磁石で回収される。200U/mlの最終濃度のキモパパイン (Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, California) が添加されて、CD34+細胞からビーズが放出され得る。

あるいは、そして好ましくは、CD34に結合するかまたはCD34に結合する抗体に結合するアフィニティーカラム単離手順が使用され得る (例えば、Ho (1995) Stem Cells 13(suppl.3):100-105およびBrenner (1993) Journal of Hematotherapy 2:7-17を参照のこと)。

別の実施態様において、造血幹細胞は、胎児性臍帯血から単離され得る。Yu (1995) Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 92:699-703は、レトロウイルスベクターを用いて、ヒト胎児性臍帯血由来CD34<sup>+</sup>細胞を形質導入する好ましい方法を記載する。

### 3. 腫瘍サプレッサー発現核酸の投与：ベクターおよび発現カセット

#### 投与の経路

本発明の治療用腫瘍サプレッサー発現核酸を含む発現カセットおよびベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソームなど）は、インビボで細胞の形質導入のための器官に直接投与され得る。投与は、血液または組織細胞との最終的な接触に分子を導入するために、例えば、全身的、局所的、または局所的に、上記に詳細に記載されるように、付加的抗癌剤の投与のために通常用いられる任意の経路による。「パッケージされた」核酸（プロモーターを有する最小の腫瘍サプレッサーコード配列で）は、任意の適切な様式で、好ましくは、薬学的に受容可能なキャリア（これもまた、上記に記載される）とともに投与される。このようなパッケージされた核酸を投与する適切な方法が利用可能であり、そして当該分野で周知である。そして、1つより多い経路が、特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路は、しばしば、別の経路より迅速かつ

有効な反応を提供し得る。

例えば、腫瘍抑制遺伝子を発現するように操作された組換えアデノウイルスベクターの投与は、アデノウイルスベクターに対する免疫応答、特に抗体応答を誘発し得る。何人かの患者は、以前から存在する抗アデノウイルス反応性抗体を有し得る。従って、何らかの状況において、腫瘍サプレッサー発現アデノウイルスベクターの全身的とは異なる局所的または局所的投与が、至適かつ最も有効である。例えば、以下に議論されるように、腹腔に限定される卵巢癌は、1つの臨床シナリオであり、ここで、局所的p53遺伝子治療（すなわち、腹腔内（IP）投与）は、好ましい治療プランとして考慮されるべきである。組換えアデノウイルスのIP投与もまた、腹腔裏層の感染、およびアデノウイルスベクターの全身循環への吸収を生じる（局所的投与の他の手段もまた、アデノウイルスベクターの全身



循環への導入を生じ得る)。この効果の程度は、IP投与されたウイルス粒子の濃度および/または総量に依存し得る。全身性効果が所望される場合、連続する何日かにわたって、より高い濃度が好適であり得る。

本発明の腫瘍サプレッサー発現アデノウイルスベクターの局所投与はまた、いくつかの状況に置いて、例えば、患者が以前から存在する抗アデノウイルス反応性抗体を有する場合に好ましい。このような「局所投与」は、例えば、腫瘍内注射（内部の場合）または粘膜適用（外部の場合）によるものであり得る。あるいは、「局所投与」効果は、例えば、リボソームまたはアデノウイルス自身において腫瘍特異的抗原認識性試薬を（抗体として）用いて、アデノウイルスベクターを腫瘍に標的化することによって影響され得る。

#### 処方物

薬学的に受容可能なキャリアは、投与される特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するのに使用される特定の方法によって、部分的に決定される。従って、本発明の薬学的組成物の広範な種々の適切な処方物が存在する。

腫瘍サプレッサー発現核酸を含む薬学的組成物の経口投与に適切な処方物は、

(a) 液体溶液（例えば、水、生理食塩水、またはPEG 400のような希釈剤に懸濁されたパッケージされた核酸の有効な量）；(b) カプセル、袋（sachset）、または錠剤（各々、予め決定された量の活性成分を、液体、固体、顆粒、またはゼ

ラチンとして含む）；(c) 適切な液体中の懸濁物；ならびに(d) 適切なエマルジョンからなり得る。錠剤形態としては、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ポテトスターチ、トラガカント、微結晶性セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、コロイド性二酸化ケイ素、クロスカルメロース(croscarmellose)ナトリウム、滑石、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ならびに他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝化剤、湿潤剤、保存料、矯味・矯臭剤、染料、崩壊剤、および薬学的に適合性のキャリアの1つ以上を含み得る。トローチ形態は、活性成分を、矯味・矯臭剤（通常は、スクロースおよびアラビアゴム、またはトラガカント）ならびに香錠中に含み得、ここで上記の剤は、上記の活性成分を、不活性ベース（例えば

、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムエマルジョン、ゲル等（活性成分に加えて当該分野で公知のキャリアを含む）中に含む。

パッケージされた核酸（単独または他の適切な成分との組合せ）は、吸入を介して投与されるようにエアロゾル処方物すなわち、霧状にされ得る）に作製される。エアロゾル処方物（は、加圧を受け入れ可能な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など）に置かれ得る。

直腸投与に適切な処方物としては、例えば、座薬が挙げられ、これは、座薬ベースとともにパッケージされた核酸からなる。適切な座薬ベースとしては、天然もしくは合成トリグリセリドまたは炭化水素パラフィンが挙げられる。さらに、例えば、液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール、および炭化水素パラフィンを含むベースとともにパッケージされた核酸の組合せからなるゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。

非経口投与（例えば、関節内（関節において）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下経路による）に適切な処方物としては、水性および非水性の等張性滅菌注射溶液（抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および処方物を意図されるレシピエントの血液と等張性にさせる溶質を含み得る）ならびに懸濁剤、可溶化剤、濃化剤、安定化剤、および保存料を含み得る水性および非水性滅菌懸濁物が挙げられる。本発明の実施において、組成物は、例えば、静脈内注入、経口的、局所的

腹腔内、膀胱内、またはくも膜下腔内によって投与され得る。非経口投与および静脈内投与は、投与の好ましい方法である。パッケージされた核酸の処方物は、単位用量または複数回用量の密封された容器（例えば、アンプルおよびバイアル）で提示され得る。

注射溶液および懸濁物のような本発明の処方物は、滅菌粉末、顆粒剤、および以前に記載された種類の錠剤から調製され得る。処方物の正確な組成、処方物中の試薬および核酸の濃度、そのpH、緩衝液、および他のパラメーターは、投与（例えば、全身的、局部的、または局所的投与かどうか）の態様および部位、ならびに、特定の薬学的組成物の保存、取り扱い、運搬、および有効期間に関する必

要性に依存して変化する。処方物の特定の必要性に依存するこれらのパラメーターの至適化は、日常的な方法によって行われ得る；そして、公知の注射用処方物のための任意の成分およびパラメーターが使用され得る。適切な処方物の一例は、例えば、1 ml当たり約 $7.5 \times 10^{11}$  から $7.5 \times 10^{10}$  粒子の濃度の本発明の組換え野生型p53発現アデノウイルスベクター (rAd5/p53)、0.42mg/mlのリン酸ナトリウム一水和物、2.48mg/mlの二塩基性リン酸ナトリウム無水物、5.8mg/mlのリン酸ナトリウム一水和物での塩化ナトリウム、20.0mg/mlのスクロース、0.40mg/mlの塩化マグネシウム六水和物であり、代表的には1.0ml投薬量で保存される。

エクスピボ治療の状況において上記のようにパッケージされた核酸によって形質導入された細胞もまた、上記のように静脈内または非経口投与され得る。

患者に投与される用量は、本発明の状況において、経時的に患者に有利な治療応答をもたらすのに十分であるべきである。この用量は、使用される特定のベクターの効力および患者の状態、ならびに処置される患者の体重または表面積によって決定される。この用量のサイズはまた、特定のベクターの投与、または特定の患者に形質導入された細胞型に付随する任意の有害な副作用の存在、性質、および程度によって決定される。

処置において投与されるべきベクターの有効量の決定において、医師は、ベクターの循環血漿レベル、ベクター毒性、疾患の進行、および抗ベクター抗体の産生を評価する。核酸についての代表的な用量は、投与の経路および遺伝子送達系に非常に依存する。送達方法に依存して、投薬量は約1  $\mu$ gから100mg以上の範囲

で容易に変動する。一般的には、ベクターからの裸の核酸の用量当量は、代表的な70キログラムの患者について約1  $\mu$ gから100  $\mu$ gであり、そしてウイルス粒子を含むベクターの用量は、治療用核酸の等しい量を得るために計算される。

投与のために、本発明の形質導入された細胞は、患者の質量および全体の健康状態に適用されるように、ベクターのLD<sub>50</sub>、形質導入された細胞型、および種々の濃度でのベクターまたは細胞型の副作用によって決定された割合で投与され得る。投与は、以下に記載のように、単回および分割用量を介して達成され得る。

好ましい実施態様において、注入の前に、血液試料が得られ、そして分析のた

めに保存される。パルス酸素測定による生命徴候および酸素飽和は念入りにモニターされる。血液試料は、好ましくは、注入後5分と1時間で得られ、そして続く分析のために保存される。エキソピボ治療において、白血球搬出法 (Leukopheresis)、形質導入、および再注入は、2から3ヶ月毎に反復され得る。最初の処置の後、注入は、臨床医の裁量で、外来ベースで実施され得る。再注入が外来として与えられる場合、その参加者は、治療後少なくとも4時間、および好ましくは8時間モニターされる。

上記のように、アデノウイルス構築物は、全身的（例えば、静脈内の）、領域的（例えば、腹腔内の）、または局所的（例えば、腫瘍内もしくは腫瘍周囲または嚢胞内注射（例えば、膀胱癌を処置するため））に投与され得る。特に好ましい投与の態様としては、動脈内注射、より好ましくは肝動脈内注射（例えば、肝腫瘍の処置のため）、または脳腫瘍への組成物の送達が所望される場合、頸動脈もしくは頸動脈系の動脈（例えば、後頭部動脈、耳介動脈、側頭動脈、大脳動脈、頸動脈など）への注射が挙げられる。肺癌の処置のための送達は、例えば、気管支鏡の使用によって達成され得る。代表的には、このような投与は、上記のような水性の薬学的に受容可能な緩衝液においてである。しかし、1つの特に好ましい実施態様において、アデノウイルス構築物または腫瘍サプレッサー発現カセットは、脂質処方物において投与される。この脂質処方物は、より好ましくは、脂質と複合体化された脂質／核酸複合体（例えば、DebsおよびZhu (1993) WO 93/24640 ; Mannino (1998) (前出) ; Rose, 米国特許第5,279,833号 ; Brigham (1991) WO 91/06309 ; ならびにFelgner (1987) (前出) に記載される）であるか、

あるいはリポソーム、より好ましくは、特定の腫瘍マーカーに指向される免疫リポソームにカプセル化されたものである。このような脂質処方物はまた、局部的、全身的に投与され得るか、またはエアロゾルを介して送達され得ることも理解される。

#### 4. 腫瘍サプレッサー送達を増強すること。

腫瘍サプレッサー送達は、1つ以上の「送達増強剤」の使用によって増強され得る。「送達増強剤」とは、治療用遺伝子の送達（例えば、癌組織または器官へ

の腫瘍抑制遺伝子の送達)を増強する任意の試薬をいう。このような増強された送達は、種々の機構によって達成され得る。1つのこのような機構は、器官または組織(例えば、膀胱)の上皮表面上の保護性グリコサミノグリカン層の破壊を含み得る。このような送達増強剤の例は、洗浄剤、アルコール、グリコール、界面活性剤、胆汁酸塩、ヘパリンアンタゴニスト、シクロオキシゲナーゼインヒター、高張塩溶液、および酢酸塩である。アルコールとしては、例えば、エタノール、N-プロパノール、イソプロパノール、ブチルアルコール、アセチルアルコールのような脂肪族アルコールが挙げられる。グリコールとしては、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および他の低分子量グリコール(例えば、グリセロールおよびチオグリセロール)が挙げられる。酢酸、グルコノール(gluconol)酢酸塩、および酢酸ナトリウムのような酢酸塩は、送達増強剤のさらなる例である。1 MNaClのような高張塩溶液もまた、送達増強剤の例である。界面活性剤の例は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)およびリゾレチン、ポリソルベート80、ノニルフェノキシポリオキシエチレン、リゾホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール400、ポリソルベート80、ポリオキシエチレンエーテル、ポリグリコールエーテル界面活性剤、ならびにDMSOである。タウロコール酸塩、タウロデオキシコール酸ナトリウム、デオキシコール酸塩、ケノデオキシコール酸塩、グリココール酸、グリコケノデオキシコール酸、および他の硝酸銀のような収斂剤が使用され得る。四級アミン(例えば、硫酸プロラミン)のようなヘパリンアンタゴニストもまた使用され得る。サリチル酸ナトリウム、サリチル酸、および非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDS)(インドメタシン、ナプロキセン、ジクロフェナクのような)のようなシクロオキシゲナーゼインヒターが使用され得る。

洗浄剤としては、アニオン性、カチオン性、双性イオン性、および非イオン性洗浄剤が挙げられる。例示的な洗浄剤としては、タウロコレート、デオキシコレート、タウロデオキシコレート、セチルピリジニウム、塩化ベナルコニウム(benalkonium)、ZWITTERGENT®3-14洗浄剤、CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオール]-1-プロパンスルフォネート水和物、Aldrich)、Big CHAP(

USSN08/889,355 (1997年7月8日出願) ; および国際出願WO 97/25072 (1997

年7月17日) に記載される)、Deoxy Big CHAP (同書)、TRITON®-X-100洗浄剤、C12E8、オクチル-B-D-グルコピラノシド、PLURONIC®-F68洗浄剤、TWEEN®20洗浄剤、およびTWEEN®80洗浄剤 (CALIBOCHEM®Biochemicals) が挙げられるが、これ

らに限定されない。

1つの実施態様において、送達増強剤は、組換えアデノウイルスベクター送達系が処方される緩衝液中に含まれる。送達増強剤は、組換えウイルスの前、またはウイルスと組み合わせて投与され得る。いくつかの実施態様において、送達増強剤は、患者への投与の直前に送達増強剤処方物とウイルス調製物を混合することによって、ウイルスとともに提供される。他の実施態様において、送達増強剤およびウイルスは、投与のために、医療提供者に、単一バイアルにおいて提供される。

送達増強剤をさらに含む緩衝液中に処方された組換えアデノウイルスベクター送達系に含まれる腫瘍抑制遺伝子を含む薬学的組成物の場合において、この薬学的組成物は、好ましくは、約5分～3時間、好ましくは約10分～120分、および最も好ましくは約15分～90分の範囲の時間にわたって投与される。別の実施態様において、送達増強剤は、腫瘍抑制遺伝子を含む組換えアデノウイルスベクター送達系の投与の前に投与され得る。送達増強剤の先行投与は、約30秒～1時間、好ましくは、約1分～10分、および最も好ましくは約1分～5分の範囲で、腫瘍抑制遺伝子を含むアデノウイルスベクター送達系の投与の前であり得る。

送達増強剤の濃度は、当業者に公知の多くの要因 (例えば、使用される特定の送達増強剤、緩衝液、pH、標的組織または器官、および投与の態様) に依存する。送達増強剤の濃度は、1%～50% (v/v)、好ましくは10%～40% (v/v)、および

最も好ましくは15%～30% (v/v) の範囲である。好ましくは、患者に投与される最終処方物中の洗浄剤濃度は、約0.5～2×臨界ミセル濃度 (CMC) である。Big CHAPの好ましい濃度は、約2～20mM、より好ましくは約3.5～7mMである。

送達増強剤を含む緩衝液は、任意の薬学的緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水またはリン酸ナトリウム／硫酸ナトリウム、Tris緩衝液、グリシン緩衝液、滅菌水、およびGoodら（1966）Biochemistry5:467に記載されるもののような当業者に公知の他の緩衝液）であり得る。アデノウイルスベクター送達系に含まれる腫瘍抑制遺伝子を含む薬学的組成物中の緩衝液のpHは、6.4～8.4、好ましくは7～7.5、および最も好ましくは7.2～7.4の範囲であり得る。

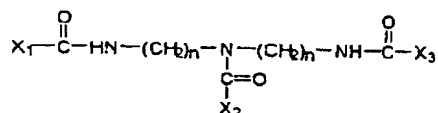
組換えアデノウイルスの投与のための好ましい処方物は、約 $10^9 \sim 10^{11}$  PN/mlウイルス、約2～10mM Big CHAP、または約0.1～1.0mM TRITON®-X-100洗剤（リ

ン酸緩衝化生理食塩水中）+約2～3%スクロース（w/v）、および約1～3mM gCl<sub>2</sub>（約pH6.4～8.4）である。送達増強剤の使用は、同時係属出願U.S.S.N. 08/779,627（1997年1月7日出願）に詳細に記載される。

市販のBig-CHAP調製物を含む核酸処方物のための改良された遺伝子移入を容易するために、Big CHAPの濃度は、その市販の供給源に依存して変動する。Big CHAPがCALBIOCHEMから供給される場合、2～10ミリモルの範囲の濃度であることが好ましい。より好ましくは、4～8ミリモルであり、最も好ましくは、約7ミリモルである。

Big CHAPがSigmaから供給される場合、15～35ミリモルの範囲のBig CHAPの濃度が好ましい。より好ましくは、20～30ミリモルである。最も好ましくは、約25ミリモルである。

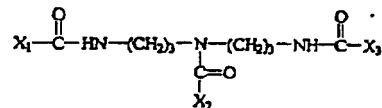
本発明のさらなる実施態様において、式Iを有する送達増強剤が提供される：



ここで、nは2～8の整数であり、X<sub>1</sub>はコール酸基またはデオキシコール酸基であり、そしてX<sub>2</sub>およびX<sub>3</sub>はコール酸基、デオキシコール酸基、およびサッカライド基からなる群から各々独立して選択される。X<sub>2</sub>およびX<sub>3</sub>の少なくとも1つは、

サッカライド基である。サッカライド基は、ペントースモノサッカライド基、ヘキソースモノサッカライド基、ペントース-ペントースジサッカライド基、ヘキ

ソース-ヘキソースジサッカライド基、ペントース-ヘキソースジサッカライド基、およびヘキソース-ペントースジサッカライド基からなる群から選択され得る。  
 。1つの好ましい実施態様において、本発明の化合物は、式IIを有する：



ここで、X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> はコール酸基およびデオキシコール酸基からなる群から選択され、そして X<sub>3</sub> はサッカライド基である。

これらの化合物は、本発明の処方物中、好ましくは約0.002～2 mg/ml、より好ましくは約0.02～2 mg/ml、最も好ましくは約0.2～2 mg/mlの範囲で使用される。最も好ましくは約2 mg/mlである。

リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）は、これらの化合物のための好ましい可溶化剤である。しかし、当業者は、特定のさらなる賦形剤および添加剤が、種々の薬学的処方物についてのこれらの薬剤の溶解度特性を達成するために所望され得ることも理解する。例えば、周知の可溶化剤（例えば、洗浄剤、脂肪酸エステル、界面活性剤）の添加は、適切な濃度で添加されて、使用される種々の溶媒における化合物の可溶化を容易にする。溶媒がPBSである場合、好ましい可溶化剤は、約0.15%の濃度のTween 80である。

#### 5. 腫瘍抑制タンパク質の投与

腫瘍抑制タンパク質（ポリペプチド）は、注射によって腫瘍部位に直接送達され得るか、または上記のように全身性に投与され得る。好ましい実施態様において、腫瘍抑制タンパク質は、薬学的に受容可能なキャリア（賦形剤）と組み合わされて、上記の薬理的組成物を形成する。腫瘍抑制ポリペプチドは、治療的に有効な用量で投与される。従って、組成物は、疾患および／またはその合併症を治療または少なくとも部分的に停止するのに十分な量で投与される。この使用のために

有効な量は、疾患の重篤度、および患者の健康の一般的な状態に依存する。

腫瘍抑制ポリペプチドは、経口的に投与される場合、消化から保護されなければ



ばならないことが認識される。このことは、代表的には、ポリペプチドを、酸加水分解および酵素的加水分解への耐性を付与する組成物と複合体化することによって、または上記のリポソームのような適切な耐性キャリア中にポリペプチドをパッケージすることによってのいずれかで達成される。経口送達のためにポリペプチドを保護する手段は、当該分野で周知である（例えば、治療剤の経口送達のための脂質組成物を記載する米国特許第5,391,377号を参照のこと）。

### III. 組み合わせ薬剤

腫瘍サプレッサーおよび付加的抗癌剤は、腫瘍抑制核酸またはポリペプチドが付加的抗癌剤の前に投与されるか（腫瘍サプレッサー前処理）、または付加的抗癌剤が腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドの前に投与される（癌薬物前処理）かのいずれかで個々に投与され得る。もちろん、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドならびに付加的抗癌剤は、同時に投与され得る。

一つの実施態様において、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドならびに付加的抗癌剤は、単一の薬理学的組成物として投与される。この実施態様において、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドならびに付加的抗癌剤は、単一の均一な送達ビヒクル中に懸濁され得るか、または可溶化され得る。あるいは、腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドならびに付加的抗癌剤は、異なる送達ビヒクル中にそれぞれ懸濁され得るか、または可溶化され得、これは、次いで投与時にまたは継続してのいずれかで単一の賦形剤中に懸濁される（分散される）。従って、例えば付加的抗癌剤は極性溶媒（例えば、エタノール中のパクリタキセル）中で可溶化され得、そして腫瘍抑制核酸は脂質と複合体化され得、これらは次いで懸濁液中で共に保存されるか、あるいは投与時に組み合わせられる。種々の適切な送達ビヒクル、賦形剤などは、上で記述する。

### IV. 処置レジメ：組み合わせ治療および個別の治療

#### A) 腫瘍サプレッサー処置レジメ

腫瘍抑制核酸またはポリペプチド、より特には腫瘍抑制核酸が、単回用量でよりも多回用量で投与された場合に、腫瘍成長を阻害することにおいて、より強い効力を示すことが、本発明の発見であった。従って本発明は、腫瘍抑制核酸また

はポリペプチドの多回投与を含む、腫瘍抑制遺伝子またはポリペプチドのための処置レジメを提供する。

腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸は、総用量が約 $1 \times 10^9$ ～約 $1 \times 10^{14}$ 、約 $1 \times 10^9$ ～約 $7.5 \times 10^{15}$ 、好ましくは約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$  アデノウイルス粒子の範囲で、以下からなる群から選択される処置レジメにおいて（付加的抗癌剤と共にまたは無しで）投与され得る：総用量単回投与で、5日間にわたって分割または5日間日毎投与される総用量、15日間にわたって分割または15日間日毎投与される総用量、および30日間にわたって分割または30日間日毎投与される総用量。この投与方法は、2回以上のサイクル（より好ましくは3回のサイクル）反復され得、そして2回以上のサイクルは3または4週間間隔をあけられ得る。処置は単回投薬サイクルからなり得るか、または投薬サイクルは、約2から約12サイクル、より好ましくは約2から約6サイクルの範囲であり得る。

特に好ましい処置レジメは、5日間にわたって分割され、そして5日間毎日毎与される総用量、15日間にわたって分割され、そして15日間日毎投与される総用量、ならびに30日間にわたって分割され、そして30日間日毎投与される総用量を含む。

いくつかの好ましい実施態様において、 $7.5 \times 10^9$ ～約 $7.5 \times 10^{15}$ 、好ましくは約 $1 \times 10^{12}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$  アデノウイルス粒子の範囲の日用量が、毎日30日までの間投与され得る（例えば、2日間、2～5日間、7日間、14日間または30日間のレジメで、各日に同用量が投与される）。多回レジメは、21日～28日の循環サイクルにおいて反復され得る。

いくつかの実施態様において、異なる投与経路により、使用する好ましい投薬範囲が異なる。例えば、肝動脈内送達では、好ましい範囲は典型的には5～14日間、1日あたり $7.5 \times 10^9$ と約 $1 \times 10^{15}$ との間、より好ましくは約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$  の間のアデノウイルス粒子である。これらのレジメはさらに付加的抗癌剤、FUDRまたは5'-デオキシ-5-フルオロウリジン（5'-DFUR）または塩酸イリノテカ

ン（irinotecan）（CPT-11;7-エチル-10-[4-(1-ピペリジノ)-1-ピペリジノ]カ

ルボニルオキシカンプトテシン)の投与を含み得る。腫瘍内送達では、好ましい範囲は、代表的には1日あたり $7.5 \times 10^9$ と約 $1 \times 10^{13}$ との間、より好ましくは約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{12}$ の間のアデノウイルス粒子である。腹腔内送達では、好ましい範囲は、代表的には5～10日間、1日あたり $7.5 \times 10^9$ と約 $1 \times 10^{15}$ との間、より好ましくは約 $1 \times 10^{11}$ ～約 $7.5 \times 10^{13}$ の間のアデノウイルス粒子である。

#### B) 組み合わせ治療処置レジメ

腫瘍サプレッサーが付加的抗癌剤と組み合わせて使用される場合、腫瘍抑制核酸は、上記の総用量で投与される。組み合わせにおいて、付加的抗癌剤は、使用される薬剤に依存した総用量で投与される。例えば、パクリタキセルまたはパクリタキセル誘導体は、単回用量、1日目および2日目に日毎投与される用量、1日目、2日目および3日目に日毎投与される用量、15日間の日投薬量、30日間の日投薬量、15日間日毎の連続注入、30日間日毎の連続注入での投与からなる群から選択される処置レジメにおいて、1時間、3時間、6時間または24時間にわたって、 $75 \sim 350 \text{mg/m}^2$ の範囲の総用量で投与される。好ましい用量は、24時間で $100 \sim 250 \text{mg/m}^2$ である。

腫瘍抑制核酸での処置に先立つ付加的抗癌剤（例えば、パクリタキセル）での前処置は、腫瘍サプレッサーの効力を高める。従って、一つの特に好ましい実施態様において、細胞、組織または生物は、腫瘍抑制核酸に先立ち付加的抗癌剤で処置される。付加的抗癌剤処理は、好ましくは、腫瘍抑制核酸処理の約24時間前までに行うが、この時間は長くてもまたは短くても容認できる。

前処理は、付加的抗癌剤がパクリタキセル様化合物、より好ましくはパクリタ

キセルまたはパクリタキセル誘導体（例えば、タキソール®またはタキソテレ®）

である場合に特に効力がある。特に好ましい腫瘍サプレッサーはRBおよびp53であり、p53、特にアデノウイルスベクター（例えば、A/C/N/53）中のp53が最も好ましい。

#### V. 転移の処置および予防

実施例2および3に例示したように、腫瘍抑制（例えば、p53）遺伝子置換治

療は、インビトロでヒト腫瘍細胞、免疫無防備状態の宿主におけるヒト腫瘍異種

移植、およびヒト肺腫瘍（インビボ）に対して効力を有することが証明された。

患者における原発性腫瘍の外科的な減量（debulking）は、しばしば、外科医によって見逃された、腫瘍細胞の微視的な「巣」に起因して、原発部位における腫瘍の再成長およびその部位からの腫瘍転移を生じる。あるいは、全ての腫瘍が原発部位から除去されることを確実にするために、患者は、原発腫瘍部位を取り囲む大量の正常組織を除去する、美観を損ねるような手術に供せられ得る。

別の実施態様においては、本発明は、転移（転移細胞）の成長および／または増殖を阻害する方法を提供する。この方法は一般的に、腫瘍サプレッサーの全身または局部投与のいずれか、より好ましくはp53またはRBの局部投与を含む。

#### A) 全身処置

実施例2および3で説明したように、腫瘍サプレッサーベクター（例えば、A/C/N/53）の全身処置（例えば、静脈内注射）は、インビボで転移の進行を阻害した。従って、一つの実施態様において、本発明は、上記のように、生物への腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドを投与することにより、転移疾患の進行を阻害する方法を提供する。腫瘍サプレッサーは、好ましくは腫瘍抑制核酸であり、より好ましくはp53腫瘍抑制核酸であり、そして最も好ましくはアデノウイルスベクター（例えば、A/C/N/53）中のp53核酸である。別の好ましい実施態様において、腫瘍抑制核酸は、リボソーム中にカプセル化されるか、または脂質と複合体化されて提供される（例えば、DebsおよびZhu（1993）WO 93/24640; ManninoおよびGould-Fogerite（1988）BioTechniques 6(7):682-691; Rose米国特許第5,279,833号; Brigham（1991）WO 91/06309; およびFelgnerら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7414を参照のこと）。

#### B) 局部処置

別の実施態様において、腫瘍抑制タンパク質または腫瘍抑制核酸の局部適用は、手術との組み合わせで好ましい。この実施態様において、腫瘍サプレッサーは、好ましくは感染ベクターの形態で、腫瘍除去後、創傷腔の表面に沿って適用される。感染粒子は、p53を創傷部位の任意の残存腫瘍細胞中へ運び、それらのアポトーシス（プログラムされた細胞死）を誘導する。この処置は患者の長期生存に

影響を与え、そして／または手術の間に除去される必要がある、腫瘍部位を取り囲む正常組織の量を減少させる。

腫瘍サプレッサーは、好ましくは、当業者により局部適用に適することが公知の多くの処方の一つで配合される。従って、例えば、ヒトp53腫瘍抑制遺伝子の感染調製物（例えば、A/C/N/53）は、創傷腔の表面に沿って広げるために適した、適切なビヒクル中（例えば、石油ゼリーまたは他のクリームまたは軟膏）に懸濁される。あるいは、腫瘍サプレッサーは、創傷腔内にスプレーとして適用するために、エアロゾルビヒクル中で調製され得る。他の実施態様において、腫瘍サプレッサーは、分解可能な（再吸収可能な）物質（例えば、再吸収可能なスポンジ）中で調製され得る。これは、創傷腔中にパッケージングされ得、腫瘍抑制タンパク質またはベクターを、時間依存的な様式で放出する。

特定の規定された局部領域、例えば、角膜、胃腸管、腫瘍切除部位への組換えアデノウイルスベクターの適用のための好ましい実施態様は、より長いインキュベーション時間を支持し、そしてウイルス感染を容易にするための固体キャリアーを使用する。キャリアーは、組換えアデノウイルス溶液に浸したガーゼまたは軟膏であり得る。ウイルスは、改善されたトランスジーン効果を達成するために、ガーゼ支持体を介して角膜に適用され得る。水気が抜けた（drained）ガーゼは、また、再発を避けるために切除した腫瘍領域に予防的に適用され得る。軟膏はまた、腫瘍抑制遺伝子治療のために、局部的に胃腸管の領域にまたは脾臓の領域に局部的に適用され得る。

例示的な軟膏キャリアーは、石油ベースのPuralube®または水溶性のKJ-Jelly®

を含む。例示的な方法において、無菌ガーゼパッド（5×5cm）または涙流試験ストリップをアデノウイルスベクター溶液（例えば、 $1 \times 10^9$  PN/ml）に、完全に湿るまで浸し得る。パッドまたはストリップを標的組織の上部に重ね、そして37℃で30分間インキュベートする。当業者は、水を吸い上げ得るか、または水と混合可能である、他の織物、ゼラチンまたは軟膏が含まれ得ることを認識する。さらに、上記のように、遺伝子移入を増強し得る他の賦形剤が添加され得る。

#### VI. 他の化学治療剤との組み合わせ処置

A) 多数の化学療法的組み合わせと組み合わせで投与される腫瘍サプレッサー

本発明の方法は、腫瘍サプレッサーと、単一の付加的抗癌剤との組み合わせに限定されないことが理解される。本方法は典型的には細胞を腫瘍サプレッサー（例えば、p53）およびバクリタキセルのような付加的抗癌剤と接触させることを含むが、本発明の方法はまた、腫瘍抑制遺伝子またはポリペプチド、および2つ、3つまたは多数の付加的抗癌剤および必要に応じて他の化学治療薬との組み合わせを細胞と接触させることを伴う。さらに、当業者は、化学治療剤がまた、付加的抗癌剤の非存在下で、腫瘍抑制タンパク質または遺伝子と共に使用され得ることを認識する。

多数の化学治療薬が科学文献および特許文献中で周知である；本発明の方法において使用され得る例示的な薬物は、以下を含むがこれに限定されない：DNA損傷剤（DNAアルキル化剤を含む）（例えばシスプラチン、カルボプラチン（例えば、Duffull (1997) Clin Pharmacokinet. 33:161-183；Droz (1996) Ann Oncol. 7:997-1003を参照のこと）、ナベルピン（navelbine）（ビノレルピン）、Asaley, AZQ, BCNU, プスルファン、カルボキシフタラトプラチナム（carboxyphthalatoplatinum）、CBDCA, CCNU, CHIP, クロラムブシル、クロロゾトシン、シスプラチナム、クロメゾン（clomesone）、シアノモルホリノードキソルビシン、シクロジゾン（cyclodisone）、シトキサン（cytoxan）、ジアンヒドロガラクトイトール、フルオロドパン（fluorodopan）、ヘプスルファム（hepsulfam）、ヒカントン、メルファラン、メチルCCNU、マイトマイシンC、ミトゾラミド（mitozolamide）、ナイトロジェンマスタード、PCNU、ピペラジンアルキレーター、ピペラジンジオン、ピボプロマン、ボルフィロマイシン、スピロヒダントインマスタード、テロキシロン、テトラプラチン、チオテパ、トリエチレンメラミン、ウラシルナイトロジェンマスタード、Yoshi-864）；トポイソメラーゼIインヒビター（例えば、トポテカンハイドロクロリド（topotecan hydrochloride）、イリノテカンハイドロクロリド（irinotecan hydrochloride）（CPT-11）、カンプトテシン、カンプトテシンNa塩、アミノカンプトテシン、CPT-11および他のカンプトテシン誘導体）；トポイソメラーゼIIインヒビター（ドキシソルビシン（リボ

ソームにカプセル化されたドキソルビシンを含む、米国特許第5,013,556号および同第5,213,804号を参照のこと）、アモナフィド、m-AMSA、アントラピラゾール（anthrapyrazole）誘導体、ピラゾロアクリジン（pyrazoloacridine）、ピサントレンHCL、ダウノルビシン、デオキシドキソルビシン、ミトキサントロン、メノガリル、N,N-ジベンジルダウノマイシン、オキサントラゾール（oxanthrazole）、ルビダゾン、VM-26、およびVP-16）；RNA/DNA代謝拮抗剤（例えば、L-アラニノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、アシビシン、アミノプテリン、アミノプテリン誘導体、アンチフォル（antifol）、Baker可溶性アンチフォル、ジクロルアリール ローソン（dichlorallyl lawsone）、ブレキナル、フトラフル（プロドラッグ）、5,6-ジヒドロ-5-アザシチジン、メトトレキセート、メトトレキセート誘導体、N-(ホスホノアセチル)-L-アスパラギン酸（PALA）、ピラゾフリン（pyrazofurin）、およびトリメトレキセート（trimetrexate））；および、DNA代謝拮抗剤（例えば、3-HP、2-デオキシ-5-フルオロウリジン、5-HP、 $\alpha$ -TGDR、アフィジコリン グリシネート（aphidicolin glycinate）、ara-C、5-アザ-2'-デオキシシチジン、 $\beta$ -TGDR、シクロシチジン、グアナゾール（guanazole）、ヒドロキシウレア、イノシン、グリコジアルデヒド、マクベシン（macbecin）II、ピラゾロイミダゾール、チオグアニン、およびチオプリン）。腫瘍抑制核酸および／またはポリペプチドはまた、ピンクリスチン、テモゾロミド（例えば、米国特許第5,260,291号を参照のこと）、およびトレミフェン（例えば、トレミフェンの情報については、米国特許第4,696,949号を参照のこと）のような化学治療剤と組み合わせても投与され得る。

関連した動物モデルにおける前臨床研究は、以下の腫瘍：SSC-9頭頸部腫瘍細胞、SSC-15頭頸部腫瘍細胞、SSC-25頭頸部腫瘍細胞、SK-OV-3卵巣腫瘍細胞、DU-145前立腺腫瘍細胞、MDA-MB-468乳ガン細胞およびMDA-MB-231乳ガン細胞を処置して、シスプラチン、カルボプラチン、ナベルピン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、メトトレキセートまたはエトポシドと組み合わせたp53アデノウイルスが、化学療法単独よりも細胞増殖をより効果的に阻害したことを示した。別の実施態様において、p53遺伝子（例えば、アデノウイルスベクター中で発現させる）、付加的抗癌剤（例えば、パクリタキセル）およびDNA損傷剤（例えば、

シスプラチン)の3つの薬物の組み合わせを使用して、抗腫瘍効力の増強が見られた。p53、パクリタキセル、およびシスプラチンの組み合わせは、卵巢腫瘍モデルにおいて効果的であることが示された。これらのデータは、臨床試験におけるp53遺伝子治療と化学療法との組み合わせを支持する。

これらの他の化学治療薬は、付加的抗癌剤の存在または非存在下において、腫瘍抑制核酸および/またはポリペプチドと組み合わせ用いられ得る。本発明はまた、上記の腫瘍サプレッサーのいずれかと組み合わせた、あるいは付加的抗癌剤と組み合わせた上記の腫瘍サプレッサーと組み合わせた、放射線治療使用を図る。

本発明の方法に従って、これらの化学療法剤のいずれもが、個別に、腫瘍抑制核酸またはポリペプチドと組み合わせ、使用され得ることがまた、理解される。

腫瘍抑制核酸(例えば、p53)が、付加的抗癌剤(例えば、パクリタキセル)およびDNA損傷剤(例えば、シスプラチン、カルボプラチンまたはナベルピン)と共にアデノウイルスベクター中で投与される場合、アデノウイルスベクターは、典型的には5~14日間、1日あたり約 $7.5 \times 10^{12}$  ~ 約 $7.5 \times 10^{13}$  アデノウイルス粒子で投与される。例えば、カルボプラチンと組み合わせた、約 $7.5 \times 10^{13}$  アデノウイルス粒子の日用量が使用され得る。一つの実施態様においては、約 $7.5 \times 10^{12}$  アデノウイルス粒子の日用量が、肺への投与に使用され得る。別の実施態様においては、p53はトポテカン(topotecan)と共に投与される。

典型的には、DNA損傷剤は、推奨される用量で投与される(例えば、Physician's Desk Reference, 第51版, Medical Economics, Montvale, NJ 1997を参照のこと)。例えば、カルボプラチンはAUC(曲線の下面積)が約6~7.5mg/ml/分を達成するように投与される。

#### プロテアーゼインヒビター

なお別の実施態様において、本発明は、腫瘍抑制核酸および/またはポリペプチドおよびプロテアーゼインヒビターの組み合わせ使用を提供する。特に好ましいプロテアーゼインヒビターは、コラゲナーゼインヒビター、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)インヒビター(例えば、Chambers (1997) J. Natl. Ca



ncer Inst. 89:1260-1270を参照のこと)を含むがこれに限定されない。好まし

い実施態様において、方法は、同時にまたは連続的に、効果的な量のプロテアーゼインヒビターおよび効果的な量の腫瘍抑制ポリペプチドおよび／または核酸を投与することを含む。プロテアーゼインヒビターである化合物の例は、科学文献または特許文献において周知である。

#### 免疫調節剤

本発明の腫瘍抑制タンパク質および核酸は、免疫調節剤と組み合わせて使用され得、そこで免疫調節剤は、過剰増殖性細胞または癌細胞に対する免疫応答（例えば、腫瘍特異抗原に対する免疫応答）をアップレギュレートするか、または、腫瘍抑制タンパク質、腫瘍抑制核酸、腫瘍抑制ベクター（例えば、抗アデノウイルス反応）および／または組み合わされた化学療法剤に対する免疫応答をダウンレギュレートするかのいずれかを行う。

従って例えば、本発明は、効果的な量の腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドを効果的な量の免疫調節剤と共に組み合わせた、連続的または同時の投与を提供する。免疫調節剤は、IL-2、IL-4、IL-10（米国特許第5,231,012号；Lalani（1997）Ann. Allergy Asthma Immunol. 79:469-483；Geissler（1996）Curr. Opin. Hematol. 3:203-208）、IL-12（例えば、Branson（1996）Human Gene Ther. 1:1995-2002を参照のこと）、およびγ-インターフェロンのようなサイトカインを含むがこれに限定されない。

免疫抑制剤として機能する免疫調節剤は、治療剤（例えば、腫瘍抑制タンパク質もしくは核酸、または付加的抗癌剤など）に対して標的付けられた免疫応答を緩和するために利用され得る。免疫抑制剤は当業者に周知である。適切な免疫抑制剤は、シクロホスファミド、デキサメタゾン、シクロスポリン、FK506（タクロリマス（tacrolimus））（Lochmuller（1996）Gene Therapy 3:706-716）、IL-10などを含むがこれに限定されない。免疫応答を調節する細胞表面レセプターに対する抗体もまた、使用され得る。例えば、B細胞、T細胞、NK細胞、マクロファージおよび腫瘍細胞上の細胞レセプターへのリガンド結合をブロックする抗体が、この目的のために使用され得る。この戦略の例としては、例えば、

Yang (1996) Gene Therapy 3:412-420 ; Lei (1996) Human Gene Therapy 7:2273-2279 ; Yang (1996) Science 275:1862-1867を参照のこと。

#### VII. 治療キット

別の実施態様において、本発明は治療キットを提供する。キットは、腫瘍抑制核酸またはポリペプチド、あるいはその薬学的組成物を含むがこれに限定されない。キットは、付加的抗癌剤またはその薬学的組成物、あるいはその薬学的組成物を含み得る。個別の投与のために、または投与前の組み合わせのために、種々の組成物が別々の容器中に提供され得る。あるいは種々の組成物は単一の容器中に提供され得る。キットはまた、本発明の方法の実施のために種々のデバイス、緩衝液、アッセイ試薬などを含み得る。さらにキットは、本発明の種々の方法（例えば、腫瘍の処置、転移の予防および／または処置、など）におけるキットの使用を教示する教育用の資料を含み得る。

キットは必要に応じて1つ以上の免疫調節剤（例えば、免疫抑制剤）を含み得る。特に好ましい免疫調節剤は、本明細書に記載したいずれかの免疫調節剤を含む。

#### VIII. 異種腫瘍抑制核酸またはポリペプチド、および他の薬剤を含む細胞

本発明はさらに、異種腫瘍抑制核酸および／または腫瘍抑制ポリペプチドを含む、トランスフェクトされた、または別に処置された原核または真核宿主細胞、例えば、動物細胞（例えば、哺乳動物細胞）を提供する。細胞は、必要に応じて付加的抗癌剤、例えばバクリタキセルまたは他の微小管に影響する薬剤をさらに含む。

適切な原核細胞は、E. coli細胞のような細菌細胞を含むがこれに限定されない。適切な動物細胞は、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞を含む。宿主細胞は、任意の哺乳動物細胞、より好ましくは任意の新生物細胞または腫瘍細胞、例えば、本明細書中に記載される任意の細胞を含むがこれに限定されない。

本明細書中に記載されるトランスフェクトされた宿主細胞は、診断または治療のための組成物として有用である。薬学的に使用された場合、これらは、エキソ

ビボの遺伝子治療のために、上記の種々の薬学的に受容可能なキャリアと組み

合わせられ得る。細胞は、上記で詳細に記載した効果的な量で、治療的にまたは予防的に投与され得る。診断的な文脈においては、細胞は、教示または他の参照目的のために使用され得、そしてこのようにトランスフェクトされ、そして／または処置された細胞の同定のための適切なモデルを提供する。

#### IX. p53アデノウイルス遺伝子治療の前臨床的および臨床的効力

アデノウイルスを介するp53遺伝子治療は、現在、いくつかの国において第I／II相臨床試験を受けている。これらの臨床試験で用いられる薬学的組成物は、本明細書中で述べるように、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下で、ヒト腫瘍抑制遺伝子を発現する、複製欠損型5型アデノウイルスベクター（「rAd5/p53」）からなる、本発明の例示的野生型p53発現アデノウイルス（rAd/p53）を含有した（Wills (1994) 前出を参考のこと）。

#### 領域投与

腹腔に限定されている卵巣癌は、領域遺伝子治療、すなわち腹腔内投与が好ましい処置計画と考えられるべきである、一つの臨床的なシナリオである。

#### 実施例

以下の実施例は例示のために提供されるが、本願発明を制限するものではない。

#### 実施例 1

#### p53およびタキソール®の組み合わせ治療

本発明は、新生物の処置において、腫瘍抑制ポリペプチドを発現する核酸およびバクリタキセルの組み合わせ投与を提供する。下記の実施例は、タキソール®

と組み合わせた、本発明のp53発現アデノウイルスが、新生物を処置する能力、およびこの組み合わせ治療が、腫瘍細胞を死滅させる点で、いずれの薬剤単独よりも効果的であったことを詳述する。

#### インビトロにおける組み合わせ治療

細胞を3つの処置レジメの内の1つに供した：処置1において、p53アデノウイルス構築物A/C/N/53への曝露24時間前に、細胞をタキソール®で前処理した。

処置2において、細胞をp53アデノウイルス構築物で前処理し、次いで後にタキソール®と接触させた。処置3において、細胞をタキソール®およびp53アデノウイルスの両方と同時に接触させた。従って、p53 Adおよびタキソール®は、互い

に24時間以内に、または同時に投与され得る。

培養培地中の約 $1.5 \times 10^4$ 細胞 ( $0.4 \mu\text{g/ml}$  コルチゾールおよび10%FBSならびに1%可決アミノ酸含有DMEM+Ham's F12培地の1:1混合物中の頭頸部細胞株SCC-9、SCC-15、およびSCC-25、ならびに10%FBSを添加したEagle's必須培地中の前立腺DU-145および卵巣SK-OV-3) を、96ウェルマイクロタイタープレート of 各ウェル

に添加し、そして $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ にて約4時間培養した。薬物 (タキソール®)、

p53アデノウイルス、または適切なビヒクル/緩衝液を各ウェルに添加した。パクリタキセルは水溶性ではないので、薬物を投与前にエチルアルコールに溶解した。次いで、細胞を $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ にて一晩培養した。リン酸緩衝液 (20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH 8.0、130mM NaCl、2mM  $\text{MgCl}_2$ 、2%スクロース) 中のp53アデノウイルスを投与した。

次いで、細胞死をMosmann (1983) J. Immunol. Meth., 65:55-63の方法に従って定量した。簡潔には、約 $25 \mu\text{l}$ の5mg/ml MTT生体染色染料[3-(4,5ジメチルチアゾール-2イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド]を各ウェルに添加し、そして $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ にて3-4時間インキュベートした。次いで、 $100 \mu\text{l}$ の10% SDS界面活性剤を各ウェルに添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ にて一晩インキュベートした。次いで、各ウェルのシグナルをMolecular devices microtiter plate reader (Thermo-Max) を用いて、定量した。特定の細胞株を使用し、そして得られた結果を表1に列挙する。

表1. 腫瘍抑制核酸と組み合わせた付加的抗癌剤タキソール®のインビトロ評価

細胞株癌	タキソール用 量( $\mu\text{g/ml}$ )	A/C/N/53用量 (m. o. i.)	処置		
			タキソール®前処置	p53前処置	同時
SK-OV-3 卵巣癌	0.37	40	付加的効果 $p \leq 0.0001$	効果なし $p > 0.2000$	付加的効果 $p \leq 0.0001$
SCC-25頭頸部 癌	0.10または 0.01	2.5または5.0	付加的効果 $p \leq 0.0001$	極僅かな効果 $p = 0.0606$	付加的効果 $p \leq 0.0001$
SCC-15頭頸部 癌	0.10または 0.01	2.5または5.0	付加的効果 $p \leq 0.002$	付加的効果 $p \leq 0.0001$	付加的効果 $p \leq 0.0001$
DU-145前立腺 癌	0.36または0.036 または0.0036	2.5または5.0	付加的効果 $p \leq 0.03$	付加的効果 $p \leq 0.0001$	付加的効果 $p \leq 0.0001$
SCC-9頭頸部 癌	0.12または0.012 または0.0012	2.5または5.0	付加的効果 $p \leq 0.01$	付加的効果 $p \leq 0.0001$	付加的効果 $p \leq 0.0001$

一般的に、p53アデノウイルスは、それが最初に添加された場合よりもタキソールの後またはそれと同時に添加される場合により効果的であった。これらの結果は、A/C/N/53とタキソール®との間の相乗的な相互作用を示唆する。

イソボログラム分析は相乗効果を確立する。

SK-OV-3(p53ヌル)卵巣腫瘍細胞を、表2に示すようにタキソールおよびp53/アデノウイルス(A/C/N/53)の併用により処置した。用量は、上記のように実施した。細胞死を上記のMTTアッセイを用いて3日目に定量した。さらに、p53Ad単独(表2に列挙した用量を使用)についての用量応答曲線を作製し(薬剤に細胞を2日間曝露後)、そしてタキソール単独についての用量応答曲線を、上記に列挙した用量を用いて実施した(薬物に細胞を3日間曝露)。

表2. タキソールおよびp53 Ad(A/C/N/53)の併用処置の処置群

群	タキソール® ( $\mu\text{g/ml}$ )	p53 AD (m.o.i.)	群	タキソール® ( $\mu\text{g/ml}$ )	p53 AD (m.o.i.)
1	0.001	0.5	25	0.001	10
2	0.01	0.5	26	0.01	10
3	0.1	0.5	27	0.1	10
4	0.5	0.5	28	0.5	10
5	1	0.5	29	1	10
6	5	0.5	30	5	10
7	10	0.5	31	10	10
8	20	0.5	32	20	10
9	0.001	1	33	0.001	25
10	0.01	1	34	0.01	25
11	0.1	1	35	0.1	25
12	0.5	1	36	0.5	25
13	1	1	37	1	25
14	5	1	38	5	25
15	10	1	39	10	25
16	20	1	40	20	25
17	0.001	5	41	0.001	50
18	0.01	5	42	0.01	50
19	0.1	5	43	0.1	50
20	0.5	5	44	0.5	50
21	1	5	45	1	50
22	5	5	46	5	50
23	10	5	47	10	50
24	20	5	48	20	50

図1は、処置の機能として（緩衝液コントロールと比較した）細胞増殖の阻害を示す。一般的に、タキソールまたはp53のいずれかの容量が増加するにつれて、いずれかの薬物単独より大きな効果を有するp53およびタキソールの併用での細胞増殖速度は低下した。

図2は、Berenbaum(1989)Pharmacol. Rev. 93-141に概説されたようなIsobole法を用いたこれらのデータのイソログラム分析を示す。タキソールとp53(A/C/N/53)との間の相乗作用は、細胞をp53(A/C/N/53)処置前にタキソールで24時間あらかじめ処置した場合に認められた。図2において、直線(ED<sub>50</sub>についてのイソボール)は、2つの薬剤を用いる処置が、付加的である場合に予測される細胞増殖に対する効果を示す。事実、認められた効果は、イソボール直線の左下に入り、これは、各薬物の推定濃度より低い濃度が必要であったこと、そして2つの薬物の間の相乗的な相互作用が生じたことを示す。

## 実施例2

### 転移に対するp53アデノウイルス媒介遺伝子治療

本発明は、転移処置の腫瘍抑制ポリペプチドを発現する核酸の投与を提供する。以下の実施例は、身体の種々の組織に感染して、そして転移を処置するための、本発明のp53発現アデノウイルスの能力を詳細に述べる。

雌複合免疫不全(scid)マウス(V(D)J組換えにおける欠損に起因するT細胞およびB細胞の両方が欠失するSCID変異が同型接合型であるマウス)に、 $5 \times 10^6$ のMDA-MB-231乳癌細胞をそれらの乳腺脂肪パッド(fat pad)中に注射した。原発性腫瘍が良好に確立され、肺に転移する時間が経過した後、原発性腫瘍を外科的に取り除いた(11日目)。マウスを、23、30、37、44日目(1qW)に静脈内A/C/N/53またはコントロール緩衝液でコントロール緩衝液または $4 \times 10^8$  C.I.U./注射でのA/C/N/53(アデノウイルス中のp53)を用いて処置した。49日目に、肺を採取し、固定し、そして染色して検鏡した。

結果を下記の表3に示す。

**表3. A/C/N/53を用いたMDA-MB-231肺転移の阻害**

処置	転移なし	≤ 6 転移	≥ 84 転移
緩衝液 n=17	11 (65%)	1 (6%)	5 (29%)
A/C/N/53 n=10	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)

このA/C/N/53処置によって、A/C/N/53をもったマウスの転移数は減少した。

第2の実験において、scidマウスまたはscid-beigeマウスの乳腺脂肪パッド中

の231腫瘍には、A/C/N/53を用いて腫瘍周囲注射を与えた。10回の注射で与えた総用量  $2 \sim 4 \times 10^8$  C.I.U. によって、肺転移したマウスのが、scidマウスで80%およびscid-beigeマウスで60%減少した。マウスあたりの転移の数もまた、いずれの肺腫瘍を有するマウスにおいても全く劇的に減少した。上記に記載されるように、A/C/N/53での静脈内投与はまた、scidマウスの肺転移に対して効力を示した。これらのデータは、A/C/N/53を用いた癌遺伝子治療が原発性腫瘍の負荷を低減することに加えて転移疾患の重篤度に影響しうることを示す。

別の実験において、雌scidマウスに、乳腺脂肪パッド中に  $5 \times 10^6$  MDA-MB-231 哺乳動物腫瘍細胞/マウスで0日目に注射した。原発性（乳腺）腫瘍を、18日目に外科的に取り除いた。マウスを、21、24、32、39、36日目に緩衝液、 $\beta$ -gal-A D、またはp53Ad(A/C/N/53)の静脈内注射で処置した。1回の注射あたりのウイルス用量は、 $4 \times 10^8$  C.I.U. (A/C/N/53) (PN/C.I.U.=23.3) および  $9.3 \times 10^9$  粒子  $\beta$ -gal 1 Ad (PN/C.I.U.=55.6;  $1.7 \times 10^8$  C.I.U.) であった。

51日目に肺および肝臓を採取し、ホルマリンで固定した。組織切片を肺腫瘍および肝腫瘍について評価した。2つの緩衝液および2つの $\beta$ -gal Adマウス由来の主要な器官を凍結切片にするため、および $\beta$ ガラクトシダーゼ酵素活性の分析のために急速凍結した。

表4. A/C/N/53を用いたMDA-MB-231肺転移の阻害

マウスあたりの肺転移	緩衝液群*	$\beta$ -gal Ad群*	p53 Ad群
$\leq 20$	11% (1)	8% (1)	21% (3)
$>20$ かつ $\leq 100$	11% (1)	33% (4)	79% (11)
$>100$ かつ $\leq 200$	33% (3)	33% (4)	0% (0)
$>200$ かつ $\leq 300$	33% (3)	17% (2)	0% (0)
$>300$	11% (1)	8% (1)	0% (0)
評価した総数	9	12	14
原発性腫瘍の再増殖	82% (9/11)	88% (14/16)	100% (14/14)

\* 転移数は、評価された数未満である。複数腫瘍は、これらの肺でともに増殖した。



緩衝液群および $\beta$ -gal Ad群での1つの肺あたりの転移数には、有意な差は認められなかった( $p=0.268$ 、表4を参照のこと)。

p53 Ad処置では、緩衝液群または $\beta$ -gal Ad群のいずれかと比較した場合、1つの肺あたりの転移数は、有意に減少した(それぞれ、 $p<0.001$ および $p<0.002$ )。転移数の減少に加えて、p53 Ad群においては、肺転移のサイズにも劇的な減少が見られた。コントロール群においては、大部分の肺からの組織切片は、新生物組織が50%以上を占めた。そして個々の腫瘍として、もはや肺の大きな面積にわたって認識できなかった。対照的に、大部分のp53 Ad群における肺転移は小さく、そして個々の腫瘍として容易に識別可能であった。

#### アデノウイルス組織分布

肝臓組織は、最も多数の感染細胞(約50%)を有し、そして $\beta$ ガラクトシダーゼ活性が強かった。肺は、組織全体にわたって均等に分布した感染細胞の分散パッチを有した。小腸および胃は、器官周辺の外側平滑筋壁中の細胞の周期的感染を有していた。管腔に沿って分散した微絨毛にも $\beta$ ガラクトシダーゼ活性が存在した。子宮周辺の外側平滑筋壁は、小腸で認められるものと同様な、細胞の周期的感染を有していた。卵巣中の大部分の間質細胞も感染した。脾臓は、器官の平滑筋成分中に分散した $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を有していた。黄紋心筋の主要な

バルク(bulk)内部には感染細胞はほとんど存在しなかった(<1%)。乳腺脂肪パッドにも下層の黄紋筋にも原発性腫瘍には感染細胞はほとんど存在しなかった。腎臓には感染細胞は存在しなかった。

#### 肝臓病理

剖検時に、全ての肝臓は肉眼では、正常であった。いずれの肝臓にも明らかな壊死は存在しなかった。しかし、アデノウイルスで処置したマウスは、有糸分裂中の細胞数の上昇、細胞封入体、ならびに肝細胞のサイズおよび形状における変化を含む、肝細胞異常を有していた(緩衝液群には存在しなかった)。

#### 実施例3

##### ヒト乳癌異種移植片に対するp53アデノウイルス媒介遺伝子治療

本発明は、腫瘍抑制ポリペプチドを発現する核酸の投与によって種々の癌の処

置を提供する。以下の実施例は、ヒト乳癌を処置するための、本発明のp53発現アデノウイルスの能力を詳述する。

ヌルまたは変異体p53を用いた腫瘍中への野生型p53の導入は、腫瘍増殖を制御するための新規な戦略を提供する。Casey ((1991)Oncogene 6:1791-1797) は、プラスミドDNAベクターを介して、インビトロで乳癌細胞中に野生型p53を導入した。プラスミドトランスフェクション後に生じたMDA-MB-468(p53<sup>mut</sup>)およびT47D(p53<sup>mut</sup>)のコロニー数は、野生型p53によって50%減少した。また、得られたコロニーのいずれも、野生型p53トランスフェクト体を発現しなかった。対照的に、MCF-7(p53wt)のコロニー数は影響されなかった。Negrini((1994)Cancer Res. 54:1818-1824)は、MDA-MB-231細胞を用いた類似の研究を行った。コロニー形成は、野生型p53を含むプラスミドでのトランスフェクションによって50%減少し、そして得られたコロニーのいずれも野生型p53を発現しなかった。逆説的にいえば、この研究において類似の結果が、MCF-7細胞でも認められた。

この実施例で記載される研究において、複製欠損、組換え、E1領域欠失、p53アデノウイルス(p53Ad; (A/C/N/53) Wills(1994)前出)の効力を、変異体p53を発現する3つのヒト乳癌細胞株、すなわちMDA-MB-231、MDA-MB-468、およびMDA-MB-435に対して試験した。MDA-MB-231細胞は、p53遺伝子のコドン280でのArgか

らLysへの変異を保有する(Bartek(1990)Oncogene 5:893-899)。MDA-MB-468細胞は、コドン273(Id.)でArgからHisへの変異を保有する。MDA-MB-435細胞は、p53遺伝子のコドン266でGlyからGluへの変異を保有する(Lesoon-Wood(1995)Hum. Gene Ther. 6:395-405)。

以前の研究では、インビトロでp53 Adを感染させた後のヒト乳房、卵巣、肺、結腸直腸、肝臓、脳、および膀胱由来の腫瘍細胞で、高レベルの野生型p53発現が示された(Wills(1994)前出、Harrisら(1996)Cancer Gene Therapy 3:121-130)。アデノウイルス媒介p53発現は、最終的に、p53ヌルまたは変異体p53腫瘍細胞での細胞形態の変化およびアポトーシスの誘導を生じる。10m.o.i. (感染多重度)でのp53 Adによる468乳癌細胞の感染は、感染後72時間までにDNA合成のほぼ100%の阻害を引き起こした。さらに、インビトロでのp53 Adでの感染は、MDA-MB-4

68およびMDA-MB-231細胞の増殖を、それぞれ、 $3 \pm 2 \text{ m.o.i.}$  および  $12 \pm 10 \text{ m.o.i.}$  のED<sub>50</sub> 値で阻害した。他の3つのp53変異体乳癌腫株の増殖はまた、低濃度のp53 Adで阻害された。ED<sub>50</sub> 値は、SK-BR-3細胞については  $16 \pm 4 \text{ m.o.i.}$  であり、T-47 D細胞については  $3 \pm 3 \text{ m.o.i.}$  であり、そしてBT-549細胞については  $2 \pm 2 \text{ m.o.i.}$  であった。p53の代わりに、E.coli  $\beta$  ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) を発現する等価な組換えアデノウイルスの30m.o.i.でのMDA-MB-468およびMDA-MB-231細胞の感染は、 $>67\%$ の $\beta$ -galポジティブMDA-MB-468細胞、および34~66%の $\beta$ -galポジティブMDA-MB-231を生じた。改変されたp53を備えた腫瘍細胞の大パネルにおいて、 $\beta$ -galポジティブ細胞の割合を、p53抗増殖効果と関連させることにより、Harrisら(前出)は、p53が誘導した阻害の程度とアデノウイルス形質導入の程度との間の強力な正の相関を示した。対照的に、通常のレベルの野生型p53を発現する細胞株は、アデノウイルス形質導入率とは独立して、p53形質導入によって最小限にしか影響されなかった。

野生型p53を含む2つのヒト乳腺細胞株であるMCF7およびHBL-100細胞の増殖は、インビトロで99m.o.i.より大きいまたは等しいp53 Ad濃度によって比較的影響されなかった。言い換えれば、MCF-7およびHBL-100細胞の成長阻害は、-231および-468細胞のED<sub>50</sub> 値より、それぞれ、少なくとも8倍および33倍高いp53 Ad濃度を必要とした。類似の組換えp53 Adを用いて、Katayose((1995)Clin. Cancer R es. 1:889-897)は、p53タンパク質発現の増加、細胞増殖の減少、およびインビトロで形質導入された-231細胞のアポトーシス細胞死の増加を実証した。この研究は、これらの-468および-231細胞を用いたインビトロ結果を、インビボでの乳癌異種移植片に拡大した。アデノウイルス媒介p53遺伝子治療の効力は、インビトロでアデノウイルス形質導入に抵抗性である、別の乳癌細胞株(MDA-MB-435)で評価される。

#### 材料および方法

##### 細胞株およびインビトロでのアデノウイルス感染

ヒト乳癌細胞株であるMDA-MB-231、MDA-MB-468、およびMDA-MB-435細胞を、AT

CC(Rockville, Maryland, USA)から得た。-231細胞を、10%ウシ胎児血清(FCS; Hyclone, Logan, Utha)含有DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY)中で37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養した。-468細胞を、10% FCS含有ライボピッツL-15培地(Life Technologies)中で37℃にて培養した。-435細胞を、15%FCSおよび10μg/ml ウシインスリン(Sigma Chem. Co., St.Louis, Missouri)含有ライボピッツL-15培地中で37℃にて培養した。

ヒト野生型p53発現およびE.coli βガラクトシダーゼ(β-gal)発現組換えアデノウイルス(rAd)の構築および伝播は、トランスジーン発現がヒトサイトメガロウイルスプロモーターによって指向される場合は、以前に記載されている(Wills(1994)前出)。リン酸緩衝液(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8.0, 130mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2%スクロース)中のアデノウイルスを投与した。C.I.U.は、細胞感染単位として定義される。感染性ウイルス粒子の濃度を、48時間の感染期間後の、ウイルスヘキソタンパク質ポジティブ293細胞を測定することにより決定した(Huyghe(1995)前出)。

p53 Adを用いたインビトロ感染研究については、細胞を12ウェル組織培養ディッシュ(Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA)中、1~5×10<sup>4</sup>細胞/ウェルの濃度でプレートした。細胞を0、10、または50m.o.i. (感染多重度=C.I.U./細胞)のp53 Adで形質導入し、そして以前記載されたように(Wills(1994)前出)72時間培養した。β-gal Adを用いたインビトロ感染研究については、細胞を、1×10<sup>5</sup>細胞/ウェルの密度でプレートした。細胞を0、10、50、または100m.o.i.のβ-gal Adで形質導入した。48時間後、細胞を0.2%グルタルアルデヒド(Sigma Chemical Co.)で固定し、次いでPBS(Life Technologies)で3回洗浄した。次いで、細胞を1mlのX-Gal溶液[N,N-ジメチルホルムアミド(10%終濃度)中、1.3mM MgCl<sub>2</sub>, 15mM NaCl, 44mM Hepes緩衝液, pH7.4, 3mMフェリシアン化カリウム、および1mg/ml X-Gal]中でアッセイした。X-Galは、Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Indianaから購入した。他の全ての化学薬品は、Sigmaから購入した。

形質導入細胞の割合を決定するために、5顕微鏡視野を各培養ウェルから計数

し、そして $\beta$ ガラクトシダーゼを発現している平均割合を各m.o.i.で3ウェルについて算出した。

#### インビボでのアデノウイルス処置

雌無胸腺ヌードマウスを、Charles River Laboratories(Wilmington, Massachusetts, USA)から購入した。全てのマウスをVAFバリア施設で維持し、そして全ての動物についての手順を、N.I.H. Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに記載された規則に従って実施した。腫瘍細胞を、皮下または乳腺脂肪パッド中に注入した。

細胞接種物は、以下のとおりである： $5 \times 10^6$ の-231細胞/マウス、 $1 \times 10^7$ のMDA-MB-468細胞/マウス、または $1 \times 10^7$ のMDA-MB-435細胞/マウス。腫瘍を、処置開始前の33日間にわたって増殖させる1つの-468実験を除いて、腫瘍を、投薬を開始する前に10～11日にわたってインビボで増殖させた。腫瘍体積は、その産物を3次元の測定物として算出した。各日数での異なる処置群についての腫瘍体積を、Statview IIソフトウェア(Abacus Concepts, Berkeley, California)を用いたスチューデント t 検定により比較した。0～4日および7～11日で投与した群についての平均阻害割合は、14日目からこの研究の終わりまでの有意値( $p < 0.05$ )を用いて算出した。

p53の特異的な効果は、p53 Adにより引き起こされる増殖阻害から、 $\beta$ -gal Adによって引き起こされる平均腫瘍増殖阻害を減じることにより、アデノウイルスベクター効果とは区別した。全てのウイルス注射は、腫瘍周囲/腫瘍内であった。一般的に、2日間の「休止期間」によって分けた、2回の5日間にわたる腫瘍治

療コース（すなわち、5回の注射）を各マウスに与えた。いくつかの場合には、この投薬レジメは2週間を超えて延長されたか、および/またはバッファービヒクルを、何回かの注射についてはウイルスと置換した。腫瘍増殖曲線を、平均腫瘍体積 $\pm$ s.e.m.で示す。

#### 組織学およびアポタグ(apoptag)免疫組織化学

組織サンプルを10%緩衝化ホルマリンで固定し、そしてMiles VIP Tissue Pro

cessor中で一晩処理し、次いでパラフィンに包埋した。5ミクロン組織切片をLeitzミクロトームで切り出した。このスライドを、日常的なHarrisのヘマトキシリンおよびエオシン染色(Lunaら(1968)、Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, New York:McGraw Hill Book Co.)で染色した。

アポタグインサイチュアポトーシス検出キットをOncor(Gaithersburg, Maryland, USA)から購入した。サンプルをキット使用法によりアッセイした。簡潔には、脱パラフィン化し、再水和した組織切片を、Oncor Protein Digesting Enzymeで処理し、TdTとともにインキュベートし、そしてアビジン-ペルオキシダーゼキット(ウサギIgG-Sigma Chem. CO. # EXTRA-3)およびDAB(Vector Lab. # SK4100)を用いて発色させた。スライドをメチルグリーンで対比染色した。

#### $\beta$ ガラクトシダーゼアッセイ

腫瘍をTBS(Triangle Biomedical Sciences, Durham, North Carolina, USA)に包埋し、そして2-メチルブタン/ドライアイス浴中で急速凍結した。凍結組織切片(8 $\mu$ m厚)を、0.5%グルタルアルデヒド中、4℃で5分間固定し、次いで、上記のように $\beta$ -gal発現についてアッセイした。

#### インテグリンFACS分析

細胞を0.02%EDTAで処理することにより懸濁し、ペレット化し、次いでPBSで2回洗浄した。次いで、細胞を $1 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で再懸濁し、そして1次抗体(終濃度1:250/ml)と4℃で1時間インキュベートした。細胞懸濁液をPBSで2回洗浄し、過剰な1次抗体を除去した。次いで、細胞をFITC結合ウサギ抗マウス附属抗体(adjunctive antibody)(終濃度1:250/ml, Zymed)で4℃で1時間インキュベートした。細胞を予めPBSで洗浄し、直ちに分析した。蛍光をFACS Vantageフローサイトメトリー(Becton Dickinson, Mountain View, California, USA)で測定した。側面の散乱および前方の散乱を同時に測定し、そして全てのデータをFACS研究ソフトウェア(Becton Dickinson)を備えたHewlett Packardコンピューターで集めた。インテグリンレセプターを検出するために用いた1次抗体を、以下の供給元から得た：抗 $\alpha_v$ (12084-018, Gibco BRL)；抗 $\beta_3$ (550036, Becto

n Dickenson) ; 抗  $\alpha\gamma\beta_3$  (MAP1976, Chemicon) ; 抗  $\beta_1$  (550034, Becton Dickenson) ; および抗  $\alpha\gamma\beta_5$  (MAB 1961, Chemicon)。

## 結果

### インビトロでのアデノウイルス形質導入効果およびp53増殖阻害

-231および-468細胞は、両方とも10m.o.i.でインビトロで高度に形質導入された。対照的に、-435細胞は、100m.o.i.でさえもほとんど形質導入されなかった。-231細胞については、細胞の8%(10m.o.i.)、46%(50m.o.i.)、および62%(100m.o.i.)が、 $\beta$ -gal Adによって形質導入された。-468細胞については、細胞の78%(10m.o.i.)、84%(50m.o.i.)、および97%(100m.o.i.)が、 $\beta$ -gal Adによって形質導入された。435細胞については、細胞の0.5%(10m.o.i.)、1%(50m.o.i.)、および1.3%(100m.o.i.)が、 $\beta$ -gal Adによって形質導入された。

50m.o.i.のp53 Adを用いた感染は、231および468細胞培養にてほぼ完全な細胞死を生じた。対照的に、p53 Adでは、435細胞の増殖についての検出可能な効果がなかった。

### ヒト乳癌異種移植片に対するp53 Ad効果

アデノウイルス媒介p53遺伝子治療は、-231および-468異種移植片に対しては非常に効果的である(図3aおよび3b)。231の実験では、 $\beta$ -gal Ad群の1匹のマウスおよびp53 Ad群の3匹のマウスは、研究の終わりには腫瘍が認められなかった。そして全ての腫瘍はp53 Adの処置の間に退化した。-231腫瘍増殖の阻害は、平均86%であった( $p \leq 0.01$ )。p53に起因する増殖阻害の成分は、平均37%であったが、その一方、アデノウイルス特異的阻害は平均49%( $p \leq 0.01$ )であった。-468腫瘍増殖の阻害は、平均74%であった( $p \leq 0.001$ )。p53 Ad群の1匹のマウスは、研究の終わりには腫瘍が認められず、そして全ての腫瘍は、p53 Adの処置の間に退化した。p53に起因する増殖阻害の成分は、平均45%であった( $p \leq 0.001$ )が

その一方、アデノウイルス特異的阻害は平均28%( $p \leq 0.05$ )であった。いずれの実験でも副作用は認められなかった。-231および-468腫瘍増殖阻害についてのED<sub>50</sub>値は、それぞれ、 $3 \times 10^8$  C.I.U. (細胞感染単位)および $2 \times 10^8$  C.I.U.であった

(図4)。-435腫瘍は、p53 Ad処置に対してほぼ完全に耐性であった(図3c)。アデノウイルスで処置した435腫瘍群での増殖阻害は、顕著ではなかった。

図5は、-231腫瘍に対する2つのp53 Ad投与レジメの効力の比較を示す。全てのマウスに、1週間当たり5回の腫瘍周囲注射を与えた。治療剤(p53 Ad)で処置した全てのマウスは、1週間当たり全体で $2.2 \times 10^8$  C.I.U./マウスを受容した。1つのグループは、週全体のアデノウイルス用量を含む単回ボーラス注射を受容した。その週の他の4回の注射は、緩衝液ビヒクルからなった(1×群)。他方の処置群は、同じAd用量を1週間当たり5回の注射に分割して受容した(5×群)。この投与レジメは、第1週および第3週の間に行った(0～4日目、14～18日目)。増殖阻害は、5×群では平均して73%であった( $p < 0.01$ )が、1×群では平均して44%のみであった(研究の最初の3週間では $p < 0.05$ 、21日目以降では有意ではない)。p53遺伝子治療の第一のサイクルは、第二のサイクルよりも有効であった。第一の治療サイクル後、1×群内の4匹のマウス、5×群内の5匹のマウス、およびビヒクルコントロール群内の1匹のマウスは無腫瘍であった。5×群内の1匹のマウスは、21日目までに非常に小さな腫瘍を再発した。さらなる「治癒」は、第二の治療サイクル後には観察されなかった。

図6は、10倍低いアデノウイルス用量で処置した、図3bに示した468腫瘍より当初4倍大きな468腫瘍を用いる実験を示す。1週間当たり $2.2 \times 10^8$  C.I.U. p53 Ad/マウスの総用量を投与した。1つの群は、1週間当たり、1回のウイルスの単回ボーラス注射、その後4回の緩衝液注射を受容した(1×群)。他の処置群は、同じウイルス用量を1週間当たり5回の注射に分割して受容した(5×群)。これらの投与スケジュールを6週間与えた。6週間にわたって投与した総ウイルス用量は、図3で使用した用量の約半分であった。この投与レジメは、p53 Adで処置したマウスの腫瘍体積に細胞増殖抑制効果を生じた( $p \leq 0.05$ )。本研究において初期に与えた処置は、後期の週に与えたよりも有効であるようであった。5×群内の1匹のマウスは21日目まで無腫瘍であった。しかし、全てのマ

ウスにおける腫瘍増殖阻害を比較したとき、1×投与レジメ(60%)は、5×レジメ(55%)より、わずかに(しかし有意ではない)より有効であった。投与終



了1週間後まで、5×群における腫瘍増殖速度は増大し始めた。研究の開始1ヶ月後は、ピヒクルコントロール腫瘍が壊死し始め、そして増殖は停滞した。

#### 繰り返しアデノウイルス曝露後のインビボ感染性

図5および6に示す研究の終了時に、いくつかの腫瘍に $\beta$ -gal Adを注射した。これらの腫瘍を24時間後に採取し、凍結組織切片を $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現についてアッセイした。p53 Adで2または6週間処置した腫瘍はなお $\beta$ -gal Adにより形質導入された。一方、形質導入は、1週間当たり5回p53 Adで6週間処置した-468腫瘍で最も低かった。5×群において注射された3つの-468腫瘍のうち1つのみに由来する切片が、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する細胞を有した。

#### p53 Adによるインビボでのアポトーシスの誘導

ヌードマウスにおけるMDA-MB-231およびMDA-MB-468乳癌異種移植片に、 $1\sim 5\times 10^8$  C.I.U.のp53Adまたは緩衝液を採取48～72時間前に注射した。p53 Adによるアポトーシスの誘導を、組織切片におけるアポタグ免疫組織化学を用いてアッセイした。p53 Adを注射した腫瘍は、腫瘍内注射した腫瘍の針の跡に沿って、および腫瘍周囲注射した腫瘍の外側の縁の周囲に広範なアポトーシスの領域を有した。対照的に、緩衝液を注射した腫瘍は、予期されたとおりに、ほんの少数のまき散らされたアポトーシス細胞を有した。

#### MDA-MB-231およびMD-MB-435細胞におけるインテグリン発現の比較

インテグリン発現のFACS分析をMDA-MB-231およびMDA-MB-435細胞において実施し、MDA-MB-435細胞の低いAd形質導入が、Ad2型、3型、および4型の内部移行に必要とされる $\alpha_v$ インテグリンの欠乏に起因するか否かを決定した(Wickhamら、(1993) Cell, 73:309-319; Wickhamら、(1994) J. Cell Biol., 127:257-264; およびMathiasら、(1994) J. Virol. 68:6811-6814)。両細胞型とも、ほぼ同レベルで $\alpha_v$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、および $\beta_1$ インテグリン部分を発現した。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ および $\beta_3$ 発現は、MDA-MB-231細胞よりもMDA-MB-435細胞においてより高かった。

考察： $2.2\times 10^9$  C.I.U. p53 Adの総用量を10回注射で投与したとき、腫瘍増殖阻

害はMDA-MB-468腫瘍について74%であり、そしてMDA-MB-231腫瘍について86%で

あったが、しかしMDA-MB-435腫瘍については有意ではなかった。MDA-MB-468腫瘍においては総応答の61%がp53特異的であったが、一方、MDA-MB-231腫瘍においては総応答の43%がp53特異的であった。 $\beta$ -gal AdがMDA-MB-231、MDA-MB-468、およびMDA-MB-435細胞にインビトロで形質導入する能力は、一般的に、インビボ結果の予測となった。同じウイルス濃度で、-468細胞は、MDA-MB-231細胞よりもわずかに高い形質導入率を有し、一方、MDA-MB-435細胞はアデノウイルス形質導入に耐性であった。インビトロでのMDA-MB-435結果は、インビボにおける非常に乏しい応答と相関した。

MDA-MB-435腫瘍を有するヌードマウスのp53-リポソームベクターでの全身処置は、腫瘍増殖阻害、そしていくつかの場合では、退縮を引き起こすことが示されている (Lesoon-Woodら、(1995) Hum. Gene Ther., 6:395-405)。p53-リポソーム処置はまた、肺転移の数を減少させた。これらの結果は、本研究におけるp53 Ad処置に対するMDA-MB-435腫瘍応答の欠如が、p53がMDA-MB-435腫瘍の増殖および転移を阻害できないことに起因しなかったことを示す。むしろ、これらの結果は、p53 Ad処置に対するそれらの未応答を引き起こしたのは、MDA-MB-435腫瘍の低いアデノウイルス形質導入効率であったことを示唆する。

$\alpha$ vインテグリンは、2型、3型、および4型のアデノウイルスの効率的な内部移行に必要とされる細胞エレメントとして包含される (Wickham (1993) 上述; Wickham (1994) 上述; およびMathias (1994) 上述)。 $\alpha$ vインテグリンは、5型Adについて同じ役割を行うようである。Wickhamら (1994) 上述は、 $\alpha$ v $\beta$ 5でトランスフェクトされた細胞において、 $\alpha$ v発現を欠く細胞または $\alpha$ v $\beta$ 3でトランスフェクトされた細胞に比較して5~10倍高い組換え5型アデノウイルスの内部移行を観察した。本明細書中で使用したp53 Adの産生のために使用されるヒト胚腎-293細胞は、 $\alpha$ v $\beta$ 1を発現するが、 $\alpha$ v $\beta$ 3インテグリンを発現しない (Bodary (1990) J. Biol. Chem. 265:5938-5941)。従って、 $\alpha$ v、 $\beta$ 1、 $\beta$ 3、および $\alpha$ 5インテグリンサブユニットの-435細胞発現を測定することが賢明であるようである。MDA-MB-231細胞およびMDA-MB-435細胞はともに、インテグリンファミリー分子をおよそ等価なレベルで発現した。従って、MDA-MB-435細胞のAd形質

導入の欠如は、 $\alpha_5$ インテグリン発現の欠乏に起因しない。現在のところ、標的細胞へのAd結合が必要とされる細胞レセプターの正体に関する文献は存在しない。MDA-MB-435細胞においてこのレセプターが欠乏しているか、またはウイルス結合、内部移行、または遺伝子発現に必要とされるある他の成分が欠損している可能性がある。

複数の治療サイクルにわたるp53 Adの継続した効力を、MDA-MB-231およびMDA-MB-468腫瘍モデルにおいて試験した。効力は継続した投与によって減少したようであるが、しかし、この効果は、より詳細に試験される必要がある。一般的な説では、アデノウイルス感染は、十分に機能的な免疫系を有する宿主において細胞傷害性T細胞により媒介される急速な炎症および細胞溶解性応答を生じるとみなされる (Wilson (1995) Nature Med. 4:887-889により概説される)。このT細胞応答は、宿主細胞において産生され、そして細胞表面でMHC部分とともに提示されるアデノウイルス抗原により刺激される。アデノウイルスにより形質導入された細胞に特異的な中和抗体は、後に免疫応答において産生され、そして最初の接種後にアデノウイルスの宿主細胞への再感染能力の減少を担うと考えられている。これらの研究において使用した無胸腺ヌードマウスは、外来抗原に対する不完全なT細胞免疫応答を有するが、しかしB細胞媒介抗体応答を生成し得る (Boven (1991) The Nude Mouse in Oncology Research. Boston: CRC Press)。中和抗アデノウイルス抗体の産生は、本研究における経時的なp53アデノウイルス (p53 Ad) 治療の効率減少を説明し得た。ヌードマウスにおける損なわれた免疫機能および腫瘍異種移植片の内部への乏しい血液供給は、6週の投与後でさえもp53 Adが部分的に有効であることおよび繰り返しp53 Ad注射後でさえも $\beta$ -gal Adに少数の腫瘍細胞が感染し得ることを説明し得た。

乳癌に加えて、多数の他の癌が、野生型p53を発現する組換えアデノウイルスで処置されている。これらの報告は、子宮頸癌 (Hamada (1996) Cancer Res. 56:3047-3054)、前立腺癌 (Eastham (1995) Cancer Res. 55:5151-5155)、頭頸部癌 (Clayman (1995) Cancer Res. 55:1-6)、肺癌 (Wills (1994) 上述)、卵巣癌 (13)、神経膠芽腫 (27, 28)、および結腸直腸癌 (13, 29) のモデルを含む。まとめると、これらのデータは、アデノウイルス媒介p53遺伝子治療の効

果を評価する、続行中の臨床調査を支持する。本結果は、変異体p53を発現する乳癌異種移植片においてインビボでの癌性細胞増殖を削減する、野生型p53の能力を示す。本研究はまた、標的細胞が適切なウイルス「レセプター」を発現するときアデノウイルスがp53についての効率的な送達ビヒクルであるようであることを確認する。

#### 実施例4

##### 腫瘍阻害における処置レジメのさらなる調査

本発明は、種々の投与レジメを用いる、腫瘍抑制ポリペプチドを発現する核酸の投与による種々の癌の処置を提供する。以下の実施例は、本発明のp53発現アデノウイルスの投与の分割投与の効力の増大を詳述する。

単回投薬レジメの効果を、一定期間にわたって投与した分割用量に比較して調べるために、MDA-MB-468およびMDA-MB-231腫瘍を注射したscidマウスを、マウス当たり総用量  $1 \times 10^9$  I.U. のp53 Ad (A/C/N/53) を、単回ボーラス注射として投与するか、あるいは1週間にわたって1日に一度、3または5回の注射に分割して投与する（図7中で矢印で示す）かで処置した。

MDA-MB-468腫瘍で得られた結果は、MDA-MB-231腫瘍で得られた結果と同様であった。これを図7a、7b、および7cに示す。一般には、分割投与は、腫瘍増殖を、単回ボーラス注射よりも良好に阻害した。5回注射投薬レジメには、3回注射投薬レジメよりも有意な向上があった。

#### 実施例5

デキサメタゾンとは、NK細胞媒介抗アデノウイルス免疫応答に関連した

##### 腫瘍増殖の阻害を沈黙させる

アデノウイルスベクターの繰り返し投与は、抗アデノウイルス免疫応答を誘導し得ることが実証されている。低用量デキサメタゾン (Dex) の免疫抑制特性が抗アデノウイルス免疫応答（例えば、NK細胞応答）を阻害し得るか否かを調べるために、scidマウスにおけるMDA-MB-231腫瘍を、デキサメタゾンの非存在下および存在下で、本発明の組換えウイルスで処置した。

約  $5 \times 10^6$  MDA-MB-231細胞/マウスを、0日目に雌scidマウスの乳腺脂肪パッ

ドに注射した。11日目に、デキサメタゾンまたはプラシボペレットを皮下移植した。5mgペレットを、83.3 $\mu$ gデキサメタゾン/日を60日間継続して放出するように設計した (Innovative Research of America, Sarasota, FL)。全てのマウスは、14～18日目および21～25日目に1日に1度与えた、全体で10回の腫瘍周囲注射を受容した (1回の注射当たり0.1ml)。総ウイルス用量は、 $2 \times 10^9$  C.I.U./マウス (p53 AD (A/C/N/53または $\beta$ -ガラクトシダーゼAd) であった。処置は、表5に列挙するとおりであった。

表5. scidマウスにおけるMDA-MB-231腫瘍の処置

群	ホルモン	遺伝子治療
1	プラシボ	緩衝液
2	プラシボ	$\beta$ -gal Ad
3	プラシボ	p53 Ad
4	デキサメタゾン	緩衝液
5	デキサメタゾン	$\beta$ -gal Ad
6	デキサメタゾン	p53 Ad

低投薬量デキサメタゾン処置は、scidマウスにおけるMDA-MB-231腫瘍の増殖率において有意な効果を有さなかった ( $p > 0.05$ )。デキサメタゾンの有害な副作用は観察されなかった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼアデノウイルスでの腫瘍の処置により、プラシボコントロール腫瘍では腫瘍増殖の有意な阻害が引き起こされた ( $p \leq 0.001$ , 21～30日目) が、デキサメタゾン処置腫瘍では引き起こされなかった ( $p > 0.05$ , 図8を参照のこと)。プラシボおよび $\beta$ -gal Adで処置した腫瘍は、プラシボおよびデキサメタゾンで処置した腫瘍よりも増殖が緩慢であった ( $p \leq 0.01$ , 23～30日目)。

プラシボコントロール腫瘍では、腫瘍増殖の有意なp53特異的阻害は存在しなかった ( $p > 0.05$ )。対照的に、デキサメタゾンおよびp53 Adで処置した腫瘍は、デキサメタゾンおよび $\beta$ -gal Adで処置した腫瘍 ( $p \leq 0.02$ , 21～30日目) またはプラシボおよびp53 Adで処置した腫瘍 ( $p \leq 0.04$ , 21～30日目) よりも増殖が有意に緩慢であった。

従って、低用量デキサメタゾン処置は、有害な副作用を伴わずに、scidマウスにおける抗アデノウイルス免疫応答（例えば、NK細胞応答）に関連した腫瘍増殖の阻害を沈黙させた。このデータはまた、低用量デキサメタゾン処置が、組換えアデノウイルスにおけるCMVプロモーターにより駆動される導入遺伝子（例えば、p53）発現を刺激し得ることを示唆する。逆に、デキサメタゾンは、アデノウイルス形質導入効率を増大させ得、それにより腫瘍細胞死を増大させ得る。

次に、MDA-MB-231乳癌モデルを用いて、マウスにおいてp53を有するまたは有さないAdの抗腫瘍効力を評価した。これらは、外来抗原に対する免疫応答を惹起させる能力が異なる。非機能的T細胞を有するヌードマウス、非機能的なT細胞およびB細胞を有するが、高められたNK細胞を有するscidマウス、および非機能的なT細胞、B細胞およびNK細胞を有するscid-ベージュマウスを研究した。

MDA-MB-231異種移植片に対するrAd5/p53（上述）の効力を研究するために：ヌードマウスに、マウス1匹当たり総用量 $2.2 \times 10^9$  C.I.U.のAdを、0～4日目および7～11日目に10回の注射に分割して与えた。SCIDマウスに総ウイルス用量 $= 4 \times 10^9$  C.I.U.を、0～4日目および7～11日目に与えた10用量に分割して与えた。SCID-ベージュマウスに総ウイルス用量 $= 1.6 \times 10^9$  C.I.U.を、0～4日目および7～11日目に与えた10用量に分割して与えた。全てのマウスを、p53 Ad、 $\beta$ -gal Ad、またはビヒクル単独で処置した。

ヌードマウス（非機能的T細胞）またはscidマウス（非機能的T細胞およびB細胞；高められたNK細胞）において、コントロールAdベクター（p53インサートなし）での腫瘍周囲投与は、腫瘍増殖のいくらかの阻害を引き起こした。p53を発現するAd（rAd5/p53）は、抗腫瘍効力をコントロールAdに比較して大いに増強した。対照的に、scid-ベージュマウス（非機能的T細胞、B細胞、およびNK細胞）においては、抗腫瘍効力は全て、腫瘍増殖阻害に対するAdベクター成分のないp53発現に起因した。これらのデータは、Ad媒介腫瘍増殖阻害におけるNK細胞についての以前には認識されていない役割を示す。データはまた、免疫系の抑制が、いくつかのベクター特異的な、NK細胞媒介性の副作用を排除し得ることを示唆する。

## 実施例6

## p53アデノウイルスと化学治療との組み合わせ処置

本発明は、新生物の処置における腫瘍抑制ポリペプチドを発現する核酸および化学治療剤の組み合わせ投与を提供する。以下の実施例は、種々の抗癌薬、シスプラチン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート、およびエトポシドと組み合わせた本発明のp53発現アデノウイルスの、新生物を処置する能力、およびこの組み合わせ治療が、いずれかの薬剤単独よりも腫瘍細胞の殺傷により有効であった、すなわち、相乗的であったことを詳述する。

インビトロで化学治療薬と共に投与されたp53

p53と組み合わせたシスプラチン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート、およびエトポシド

本発明の腫瘍抑制ベクター (A/C/N/53) と組み合わせた臨床的に関連した抗癌薬であるシスプラチン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート、およびエトポシドの効果を、インビトロで調べた。SCC-9頭頸部扁平上皮細胞癌、SCC-15頭頸部扁平上皮細胞癌、SCC-25頭頸部扁平上皮細胞癌、およびDU-145前立腺癌細胞を、3つの処理レジメの1つに供した：処理1では、細胞を、p53アデノウイルス構築物A/C/N/53に曝露する24時間前に抗癌化学治療剤で前処理した。処理2では、細胞を、p53アデノウイルス構築物で前処理し、次いで後に抗癌化学治療剤と接触させた。処理3では、細胞を、抗癌化学治療剤およびp53アデノウイルスの両方と同時に接触させた。

全細胞株をATCC (Rockville, MD) から得た。SCC-9、SCC-15、およびSCC-25頭頸部腫瘍細胞 (p53<sup>null</sup>) を、10%ウシ胎児血清 (FCS; Hyclone, Logan, Utah)、0.4  $\mu$ g/mlヒドロコルチゾン (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)、および1%非必須アミノ酸 (GIBCO) を有するDMEMおよびHam's F-12 (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY) の1:1混合物で、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。SK-OV-3ヒト卵巣腫瘍細胞 (p53<sup>null</sup>) およびDU-145ヒト前立腺腫瘍細胞 (p53<sup>null</sup>) を、イーグルMEM+10%FCSで、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。MDA-MB-231ヒト乳腫瘍細胞 (p53<sup>mut</sup>) を、10%ウシ胎児血清 (Hyclone) を有するDMEM (GIBCO) で、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。MDA-MB-468ヒト乳腫瘍細胞 (p53<sup>mut</sup>) を、10%FCS

を含むL

eibovitz's L-15培地 (GEBCO) で、37℃、CO<sub>2</sub>なしで培養した。

MDA-MB-231乳腫瘍細胞は、p53遺伝子のコドン280でArgからLysへの変異を有し、変異体p53を発現する (Bartek (1990) 上述)。DU-145前立腺腫瘍細胞は、異なる染色体上に2つのp53変異、すなわち、コドン223におけるProからLeuへの変異およびコドン274におけるValからPheへの変異を有し (Isaacs (1991) Cancer Res. 51:4716-4720)、変異体p53を発現する。SK-OV-3卵巣腫瘍細胞は、p53-ヌルである (Yaginuma (1992) Cancer Res. 52:4196-4199)。SCC-9細胞は、コドン274と285との間に欠失を有し、これがフレームシフト変異を生じる；SCC-9核では検出可能な免疫反応性p53タンパク質は存在しない (Jung (1992) Cancer Res. 52:6390-6393；Caamano (1993) Am J. Pathol. 142:1131-1139；Min (1994) Eur. J. Cancer 30B:338-345)。SCC-15細胞は、コドン224とコドン225との間に5塩基対の挿入を有する；それらは、低レベルのp53 mRNAを生じるが、検出可能なp53タンパク質を生じない (Min (1994) 上述)。SCC-25細胞は、第17染色体でヘテロ接合性の欠損 (LOH)、および残りの対立遺伝子でコドン209の2塩基対欠失を有する；SCC-25細胞では検出可能なp53 mRNAは存在せず、核においても免疫反応性p53タンパク質は観察されない (Caamano (1993) 上述)。培養培地中約 $1.5 \times 10^4$ 細胞 (実施例1に記載) を、96ウェルマイクロタイタープレート上の各ウェルに添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で約4時間培養した。

ヒト野生型p53およびE. coliガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) アデノウイルス (Ad) の構築および増殖は、以前に記載されている (Wills (1994) 上述)。感染性ウイルス粒子の濃度を、ウイルス性ヘキソンタンパク質ポジティブ293細胞の濃度を48時間感染期間後に測定することにより決定した (Huyghe (1995) 上述)。C.I.U. は、細胞感染単位として定義される。p53発現アデノウイルスを、リン酸緩衝液 (20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.0、130mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、2%スクロース) 中で投与した。薬物、p53アデノウイルス、または適切なビヒクル/緩衝液を各ウェルに添加した。p53 Adを用いるインビトロ研究のために、細胞を $1.5 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート上にプレートし、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で4時間



培養した。薬物、p53 Ad、または適切なビヒクルを各ウェルに添加し、細胞培養を一晩続けた。次いで、薬物、p53 Ad、または適切なビヒクルを各ウェルに添加

した。細胞培養をさらに2日間続けた。

次いで、細胞死を、Mosmann (1983) J. Immunol. Meth., 65:55-63により記載のようなMTTアッセイに従って定量した。簡単に述べると、約25  $\mu$ lの5 mg/ml MTT生体染色剤 [3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド] を各ウェルに添加し、37℃、5 %CO<sub>2</sub> 下で3～4時間インキュベートさせた。次いで、100  $\mu$ lの10%SDS界面活性剤を各ウェルに添加し、37℃、5 %CO<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートさせた。次いで、各ウェル中のシグナルをMolecular devicesマイクロタイタープレートリーダーを用いて定量した。

シスプラチン (結果の要約については表6を参照のこと)、ドキソルビシン (結果の要約については表7を参照のこと)、5-FU、メトトレキサート、およびエトポシドを用いる全ての場合において、組み合わせ治療は、いずれかの薬剤単独よりも腫瘍細胞の殺傷においてより有効であった。メトトレキサートおよびp53 Adの組み合わせを1つの細胞株において試験した。SCC-15細胞を0.7  $\mu$ Mメトトレキサートで、5m.o.i. p53 Adの24時間前に処理したとき、2つの薬物の組み合わせ抗増殖効果はp53 Ad単独よりもほんの5 %高いのみであったが、この差異は統計学的に有意であった ( $p \leq 0.003$ )。5または10m.o.i. p53 Adの24時間前の2.6  $\mu$ MエトポシドでのDU-145細胞の前処理は、いずれかの薬物単独よりもより大きな組み合わせ効力を生じた ( $p \leq 0.0001$ )。SCC-15細胞を0.3  $\mu$ Mエトポシドで、5m.o.i. p53 Adの24時間前に処理したとき、2つの薬物の組み合わせ抗増殖効果はp53 Ad単独よりもほんの5 %高いのみであったが、この差異もまた統計学的に有意であった ( $p \leq 0.003$ )。腫瘍抑制遺伝子治療および抗新生物剤の組み合わせは、拮抗作用を示さなかった。

第二の実験では、正常細胞 (MRC-9細胞) の処理の効力を腫瘍細胞と比較した (図9)。この実験では、増殖を、MTTアッセイよりむしろ<sup>3</sup>H-チミジン取り込みとしてアッセイした。正常細胞 (2倍体線維芽細胞MRC-9細胞) は、組み合わせ処理で、より目立った効果を示さなかった。予期されたように、腫瘍サプレッサ

一単独の効果は、正常細胞では無視できる程度のものであり、そして腫瘍細胞では非常に有意であった。対照的に、抗癌化学治療剤単独（例えば、シスプラチン、ドキソルビシン、5-FU、メトトレキサート、およびエトポシド）は、ガン細胞

よりも正常細胞においてより有効であった（図9を参照のこと）。

**表6. シスプラチンと組み合わせたp53 Adの抗増殖効果**

より大きな併用の効力？					
細胞株	p53タンパク質	組織型	最初に シスプラチン	最初にp53 Ad	同時
SK-OV-3	ヌル	卵巣	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
SCC-9	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
SCC-15	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	ND	ND
SCC-25	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
NDA-MB-468	変異体	胸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	ND	有り ( $p \leq 0.0001$ )
NDA-MB-231	変異体	胸部	有り ( $p \leq 0.0002$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )

ND=実施されず

**表7. ドキソルビシンと組み合わせたp53Adの抗増殖効果**

より大きな併用の効力？					
細胞株	p53タンパク質	組織型	最初に ドキソルビシン	最初にp53 Ad	同時
SK-OV-3	ヌル	卵巣	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
SCC-9	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
SCC-15	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
SCC-25	ヌル	頭頸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
DU-145	変異体	前立腺	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )
MB-231	変異体	胸部	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )	有り ( $p \leq 0.0001$ )

ヒト肝臓癌に対するドキソルビシンおよびp53の効果

以下の実施例は、ドキソルビシンと組合せた本発明のp53発現アデノウイルス

の、新生物を処置する能力について詳述し、そして併用治療がいずれかの薬剤単独よりも腫瘍細胞を死滅させることにおいてより効果的であったこと、すなわち相乗的であったことを詳述する。結果は、本発明のp53発現ベクター（ACN53）とドキソルビシンとの間の相乗相互作用を実証する。

ドキソルビシン（アドリマイシン）およびp53（ACN53、ヒト野生型p53トランスジーンを発現する組換えアデノウイルス構築物）を、以下の細胞株に投与した：変異型p53を有するヒト肝臓癌細胞株HLE（Hsu（1993）*Carcinogenesis* 14:987-992；Farshid（1992）*J. Med. Virol.* 38:235-239；Dor（1975）*Gann*.66:385-392）；変異型p53（*ibid*）を有するヒト肝臓癌細胞株HLF；p53を有さないヒト肝臓癌細胞株Hep 3B（Hasegawa（1995）*In Vitro Cell Dev Biol Anim.*31:55-61）；野生型p53を有する肝臓癌Hep G2（*ibid*）；および野生型p53を有するヒト肝臓腺癌SK-HEP-1（Lee（1995）*FEBS Lett.*368:348-352）。細胞生存率は、生細胞プローブcalcien AM（Molecular Probes）を用いて測定した（例えば、Poole（1993）*J. Cell. Sci.*106:685-691を参照のこと）。基質であるcalcien AMは細胞エステラーゼによって切断され、蛍光産物を生成する。

細胞を96ウェルプレートにプレーティングし（ $5 \times 10^3$ 細胞／ウェル）、一晚の間接着させ、ドキソルビシン処理についての用量応答曲線がACN53の各用量で作成されるように0日目にACN53の希釈物およびドキソルビシンの希釈物で3連で処理した。3日目に培地を吸引して、PBS中のcalcien AMを細胞に添加した。各ウェルの蛍光強度を、蛍光プレートリーダーを用いて決定した。細胞を含まないウェル由来の蛍光の値を減算し、そしてデータを未処理コントロールウェルと比較して、生存率（%）（蛍光強度）として表した。ED<sub>50</sub> 値を用いてイソボログラムプロットを作成し、ACN53とドキソルビシンとの間の相互作用を評価した。

各細胞株についてのイソボログラム分析は、本発明のp53発現ベクター（ACN53）とドキソルビシンとの相乗相互作用を示した；この相乗効果は細胞株のp53の状態に非依存的であった。しかし、ドキソルビシン非存在下におけるACN53についてのED<sub>50</sub> は、野生型p53細胞株においての方がp53改変株においてより高い。

別の類似の実験において、HLE細胞を96ウェルプレートにプレーティングし

( $5 \times 10^3$  細胞/ウェル) ; 一晚の間接着させ ; そして、ドキソルビシン処理についての用量応答曲線がACN53の各用量で作成されるように、ACN53の希釈物およびドキソルビシンの希釈物で3連で処理する。3つの群を用いてACN53とドキソルビシンとの間の相互作用における投与順序に対する効果を試験した。

群	0 日目	1 日目	2 日目	3 日目
同時	ACN53、ドキソルビシン			回収
最初にACN53	ACN53	ドキソルビシン		回収
最初にドキソルビシン	ドキソルビシン	ACN53		回収

最初の処理の後、細胞を3日間インキュベートした。培地を吸引して、PBS中のcalci en AMを細胞に添加した。各ウェルの蛍光強度を、蛍光プレートリーダーを用いて決定した。細胞を含まないウェル由来の蛍光の値を減算して、そしてデータを未処理コントロールウェルと比較して、生存率(%) (蛍光強度)として表した。ED<sub>50</sub>の値を用いてイソボログラムプロットを作成し、ACN53とドキソルビシンとの間の相互作用を評価した。各投与レジメについてのイソボログラム分析は、類似の相互作用を示し、このことは処理の投与順序に非依存적であるHLE細胞におけるACN53とドキソルビシンとの間の相乗効果と一致した。

インビボでの化学治療薬を伴うp53

本発明の腫瘍抑制ベクター (A/C/N/53) と組み合わせての、臨床的に関連のある抗癌薬物であるシスプラチン、ドキソルビシン、および5-フルオロウラシル (5-FU) の効果をインビボでさらに調査した。

C.B.17/ICR-scidマウスをTaconic Farm (Germantown, NY) またはCharles River Laboratories (Wilmington, MA) から購入した。胸腺欠損nu/nuマウスをCharles River Laboratoriesから購入した。全てのマウスをVAF-障壁 (barrier) 施設において維持し、そして全ての動物の手順をN.I.H. Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに記載の規則に従って行った。各々の日においての異なる処置群についての腫瘍体積をStatview11ソフトウェア (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用いてスチューデントのT検定によって比較した。腫瘍増殖曲

線を構築して、平均腫瘍体積 $\pm$ s.e.m.を示した。通常1群あたり10匹のマウスが存在する。

SK-OV-3卵巣腫瘍モデル：

樹立された腹腔内SK-OV-3腫瘍をビヒクル、p53Ad、シスプラチンまたは両方の薬剤の腹腔内用量で処置した。2週間の期間にわたって、マウスにp53Adを6回注射した。総ウイルス用量は $1.5 \times 10^9$  C.I.U.であった ( $3.1 \times 10^{10}$  ウイルス粒子)。

シスプラチン効力：0日目に、雌性scidマウスに $5 \times 10^6$  SK-OV-3卵巣腫瘍細胞をI.P.で注射した。6、8、10、13、15、および17日目に、マウスにI.P.で投与した (p53 Adは17日目のみ)。マウスに総用量0.2mlを投与した (0.1mlシスプラチンビヒクルまたはシスプラチンおよび0.1ml Ad緩衝液もしくはp53 Ad)。p53 Ad用量は $2.5 \times 10^8$  C.I.U./マウス/日であった ( $5.2 \times 10^9$  ウイルス粒子)。シスプラチン用量は2 mg/kg/日であった。20日目に腫瘍を回収して、そして重量を測定した。

1つの処置群におけるマウスには最初の5回のp53 Ad用量と同時にシスプラチンの5回用量を投与した。腹腔内p53 Adのこの用量によって、20日目までにマウス腫瘍負荷はほんの17%減少した ( $p \leq 0.01$ )。しかし、シスプラチンと組み合わせた場合、p53 Adは、シスプラチン単独と比較して腫瘍負荷の38%の減少を起こした ( $p \leq 0.0008$ )。薬物ビヒクルで、またはp53 Ad単独で処置したマウスは血性 (bloody) 腹水症、および横隔膜筋に侵襲性腫瘍塊を有した。これらの症状はシスプラチン単独で処置したマウス、またはp53 Adとともに、シスプラチンで処置したマウスには存在しなかった。

シスプラチン/パクリタキセル効力：0日目に、雌性scidマウスに $2.5 \times 10^6$  SK-OV-3卵巣腫瘍細胞をI.P.で注射した。7、9、11、16、および18日目に、マウスにI.P.で投与した。マウスに総容量0.3mlを投与した (0.1mlシスプラチンビヒクルまたはシスプラチンおよび0.1mlパクリタキセルビヒクルまたはパクリタキセルおよび0.1ml Ad緩衝液またはp53 Ad)。p53 Ad用量は $2.5 \times 10^8$  C.I.U./マウス/日である ( $5.2 \times 10^9$  ウイルス粒子)。シスプラチン用量は0.5mg/kg/日であつ

た。パクリタキセル用量は1mg/kg/日であった。30日目に腫瘍を回収して、そして重量を測定した。1群あたり $n = 7 = 10$ マウス。

この第2の研究において、SK-OV-3卵巣腫瘍を腹腔内用量のビヒクル、p53 Ad、シスプラチンおよびパクリタキセル、または3つすべての薬物で同時に処置した。

3つ全ての薬物の組合せは、シスプラチンおよびパクリタキセルの組合せよりも34%多く腫瘍負荷を減少させた。このことは3つの薬物の組合せの増強された効力を示す ( $p \leq 0.0006$ )。

#### DU-145前立腺腫瘍モデル：

シスプラチン効力：

腹腔内DU-145腫瘍を、ビヒクル、p53 Ad、シスプラチンまたは両方の薬物で腹腔内用量で処置した。0日目に、雄性scidマウスに $2.5 \times 10^6$  DU-145細胞をI.P.で注射した。7、9、11、14、および16日目に、マウスにI.P.で投与した。マウスに総用量0.2mlを投与した(0.1mlシスプラチンビヒクルまたはシスプラチンおよび0.1ml Ad緩衝液またはp53 Ad)。p53 Ad用量は $8.3 \times 10^8$  C.I.U./マウス/日であった ( $2.9 \times 10^{10}$  PN)。シスプラチン用量は1mg/kg/日であった。22日目に腫瘍を回収して、そして重量を測定した。p53 Adとシスプラチンとの組合せは、いずれかの薬剤単独の場合と比較して、抗腫瘍効力を非常に増強した ( $p \leq 0.0004$ )。

#### MDA-MB-468乳腺腫瘍モデル：

シスプラチン効力：

樹立したMDA-MB-468腫瘍を、ビヒクル、p53 Ad、シスプラチンまたは両方の薬物で処置した。0日目の投与開始の11日前に、雌性scidマウスに、乳腺脂肪パッド中に $1 \times 10^7$ のMDA-MB-468細胞を注射した。腹腔内シスプラチン用量は1mg/kg/日であった。0～4日目に、 $8.3 \times 10^8$  CIU/マウス/日の腫瘍内p53 Ad用量 ( $2.9 \times 10^{10}$  ウイルス粒子)を同時に投与した。シスプラチンと組み合わせた場合、p53 Adは効力を増強させた (8～31日目、 $p \leq 0.0004$ )。

ドキソルビシン効力：

第2の実験において、MDA-MB-468腫瘍をビヒクル、p53 Ad、ドキソルビシンま

たは両方の薬物で処置した。0日目の投与の開始の12日前に、雌性ヌードマウスに、 $1 \times 10^7$ のMDA-MB-468細胞を皮下に注射した。0、2、7および9日目の腹腔内ドキソルビン用量は、4mg/kg/日であった。0～4日目、および7～11日目の腫瘍内p53 Ad用量は、 $5 \times 10^8$  CIU/マウス/日であった ( $1.03 \times 10^{10}$  ウイルス粒子)。ドキソルビンと組み合わせて投与した場合、p53 Adはより強い効力

を有した (14～24日目、 $p \leq 0.05$ )。

#### SCC-15頭頸部腫瘍モデル：

##### 5-フルオロウラシル効力：

皮下SCC-15腫瘍をビヒクル、p53 Ad、5-フルオロウラシル (5-FU) または両方の薬物で処置した。0日目の投与開始の7日前に、scidマウスに  $5 \times 10^6$  のSCC-15細胞を皮下に注射した。0、7および14日目に (3週間の間、週1回) I.P. で与えられた40%ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストラン (Cerestar Inc., Hammond, IN) 中の、腹腔内5-フルオロウラシル用量は50mg/kg/日であった。0、1、7、8、14および15日目 (3週間の期間にわたって6回腫瘍内注射) のp53 Ad用量は、 $2 \times 10^8$  CIU/マウス/日であった ( $4 \times 10^9$  ウイルス粒子)。50mg/kgの5-FU用量が投与された。p53 Adおよび5-FUの組合せは、いずれかの薬物を単独で使用的場合よりも強い抗腫瘍活性を生じた ( $p \leq 0.04$ )。

##### FPTインヒビターを伴うp53

A/C/N/53と名付けられた腫瘍抑制ベクターと組み合わせたファルネシルタンパク質トランスフェラーゼインヒビターの効果は、インビトロにおいて調査された。以下の実施例は、1996年12月19日に出願された国際出願W097/23478に記載されるように (ここでFPT39は化合物「39.0」と名付けられている。W097/23478の95頁を参照のこと)、「FPT39」と名付けたFPTインヒビターと組み合わせた本発明のp53発現アデノウイルスの新生物を処置する能力、ならびに前立腺腫瘍細胞および乳腺腫瘍細胞に対する併用治療に対してはいずれの薬剤単独よりも腫瘍細胞の殺傷についてより効果的であることについて詳述する。

SK-OV-3卵巣腫瘍に対するrAd5/p53およびFPT39の抗増殖効力

方法：SK-OV-3ヒト卵巣腫瘍細胞 (p53<sup>null</sup>) を、10%ウシ胎仔血清を添加したE

agle's MEM中で1ウェルあたり250細胞の密度で、96ウェルプレートにアリコートした。次いで細胞を37℃および5%CO<sub>2</sub>で4時間インキュベートした。FPT39または薬物ビヒクルを各ウェルに添加して、そして細胞培養を3日間の間続けた。3日後、いくつかのウェル中の非処理細胞を、添加するべきrAd5/p53の量を計算するために計数した。次いで、rAd5/p53または薬物ビヒクルを各ウェルに添加し、そして細胞培養をさらに3日間継続した。細胞増殖はMTTアッセイを用いて測定

した。簡単にいうと、25  $\mu$ lの5 mg/ml MTT生体染料である[3-(4,5ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド]を各ウェルに添加して、そして3～4時間の間、37℃および5%CO<sub>2</sub>でインキュベートさせる。次いで、100  $\mu$ lの10%SDS界面活性剤を各ウェルに添加し、そして一晩インキュベーションを継続した。各ウェルの蛍光を、Molecular Devicesマイクロタイタープレートリーダーを使用してクエンチした。細胞増殖データを、O'ConnellおよびWolfinger (1997) J. Comp. Graph. Stat. 6:224-241のThin Plate Spline統計学的方法論を用いて分析した。

結果：rAd5/p53およびFPT39は、細胞増殖を阻害するさらなる効力を有する。本実験では、相乗作用 ( $p > 0.05$ ) および拮抗作用 ( $p > 0.05$ ) のいずれも示されなかった。

DU-145前立腺腫瘍細胞に対するrAd5/p53およびFPT39 (FPTインヒビター) の抗増殖および相乗効力

方法：DU-145ヒト前立腺腫瘍細胞 (P53<sup>mut</sup>) を、FPT39または薬物ビヒクルおよびrAd5/p53で処理し、そしてその後、SK-OV-3ヒト卵巣腫瘍細胞について上記のように細胞培養物を分析した。実験は2回繰り返した。

結果：実験1：rAd5/p53およびFPT39は、細胞増殖を阻害するさらなる効力を有した。本実験では、相乗作用 ( $p > 0.05$ ) および拮抗作用 ( $p > 0.05$ ) のいずれも示されなかった。

実験2：rAd5/p53およびFPT39は、相乗効力 ( $p = 0.0192$ ) を有した。これらの結果はrAd5/p53およびFPT39が相互作用し得、そして前立腺腫瘍細胞増殖に対して相乗効力を有することを示す。



MDA-MB-231乳腺腫瘍細胞に対するrAd5/p53およびFPT39（FPTインヒビター）の抗増殖および相乗効力

方法：MDA-MB-231ヒト乳癌細胞（P53<sup>mut</sup>）を、FPT39または薬物ビヒクルおよびrAd5/p53で処理し、そしてその後、SK-OV-3ヒト卵巣腫瘍細胞について上記のように細胞培養物を分析した。実験は2回繰り返した。

結果：実験1：rAd5/p53およびFPT39は、さらなる効力を有した。本実験では、相乗作用（ $p > 0.05$ ）のどちらも示されなかった。

実験2：rAd5/p53およびFPT39は、応答表面のほとんどに対してさらなる効力を示した。しかし、相乗作用は70以上のisobole（すなわち、殺傷された細胞は30%未満、 $p = 0.0001$ ）において顕著であった。これらの結果は、rAd5/p53およびFPT39が相互作用し得、そしてヒト乳癌細胞増殖に対して相乗効力を有することを示す。

#### 実施例7

p53を保有するアデノウイルスベクターで処置した

転移性肝癌を有する患者での免疫応答プロフィール

本発明は、新生物の処理における、p53を発現する核酸および他の化学治療剤のインビボ組合せ投与を提供する。以下の実施例は、本発明のp53発現アデノウイルスが、ヒト肝癌内で見出される腫瘍殺傷リンパ球のレベルを増加させる能力について詳述する。

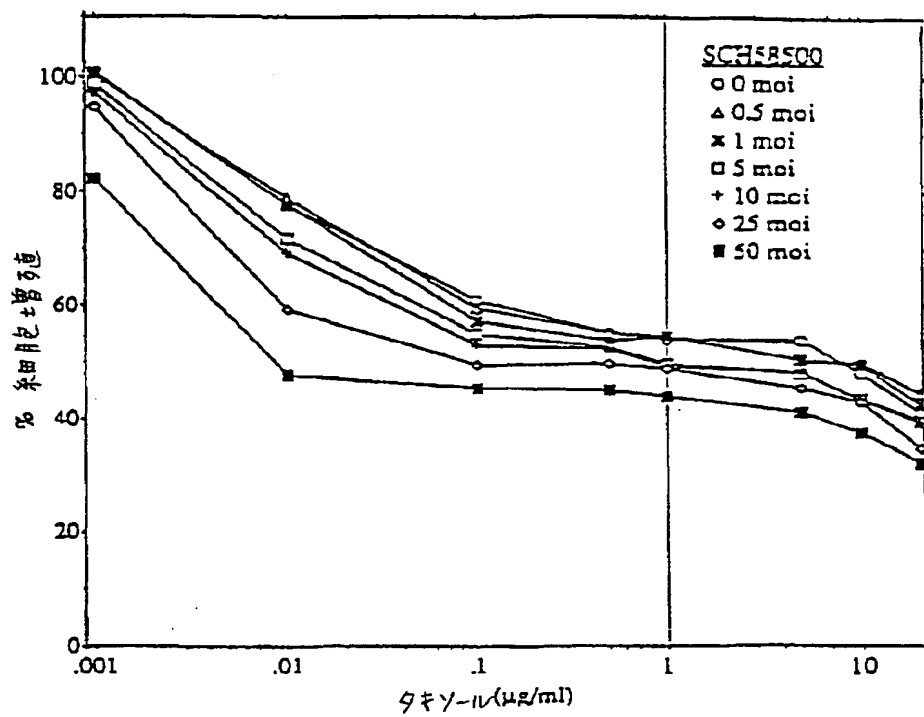
本研究の目的は、p53変異を有する結腸由来の転移性肝癌における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の遺伝子型および表現型を特徴づけることであった（TILの議論については、例えば、Wang（1997）Mol.Med.3:716-731；Marrogi（1997）Int.J.Cancer 74:492-501を参照のこと）。16患者全ては用量段階的増大様式（ $10^9 \sim 10^{11}$  粒子）において、野生型p53遺伝子を保有するアデノウイルスベクターを有する肝動脈疎通（Canalization）を介して、処理した。各患者由来の4つの生体組織検査全てを、アデノウイルスベクター投与後3～7日目に得た。免疫組織化学的分析を、正常肝臓および腫瘍-宿主組織界面部位から得た凍結組織で行った。コンピュータ補助画像分析を行って以下のモノクローナル抗体に対する免疫反応

性を定量した：CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD56、HLA-DR、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ およびIL-2。TIL (CD3<sup>+</sup> およびCD4<sup>+</sup>) 集団における増加 ( $7.5 \times 10^{10}$  粒子で最大を有する) を観察した。より高用量では、CD3<sup>+</sup> およびCD4<sup>+</sup> 集団における減少を観察した。逆の相関関係をCD8<sup>+</sup> 細胞について観察した。より高用量 ( $2.5 \times 10^{11}$ ) では、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> 集団においての増加を、正常細胞と比較して腫瘍細胞において観察した。これらの結果は、高用量のアデノウイルス粒子の送達で、CD4<sup>+</sup> およびCD8<sup>+</sup> 集団からなる増加したTILを生じることを示す。

本明細書中に記載される実施例および実施態様は単に例示の目的のためであって、そしてこれらを考慮した種々の修飾または変更が当業者に示唆され、そして本出願の精神および範囲ならびに添付の請求の範囲の範囲内に含まれることが理解される。本明細書中に引用された全ての刊行物、特許、および特許出願が、全ての目的のために本明細書中に参考として援用される。

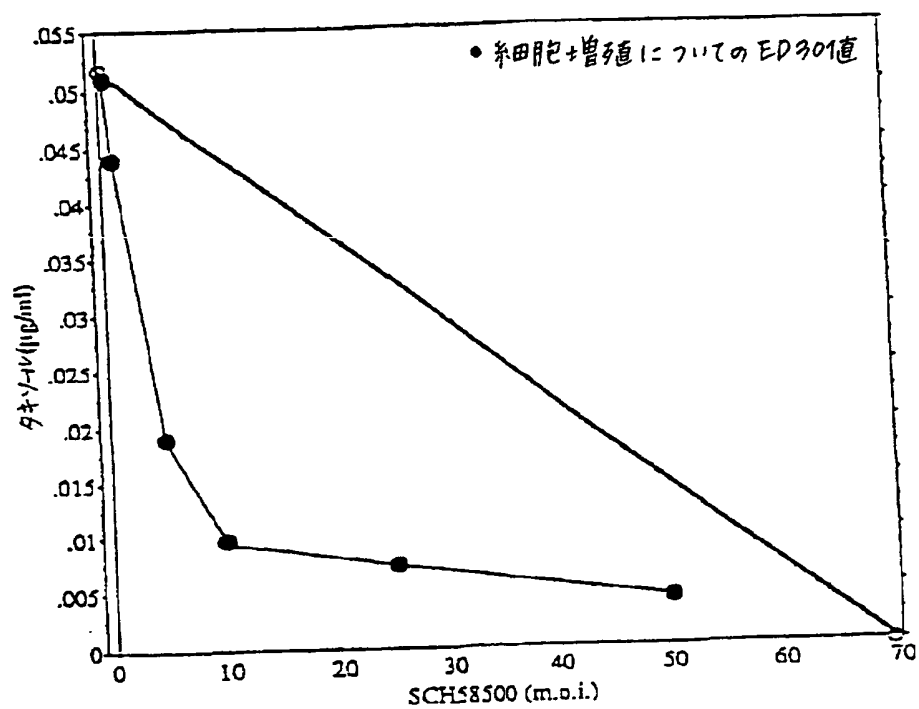
【図1】

Fig. 1



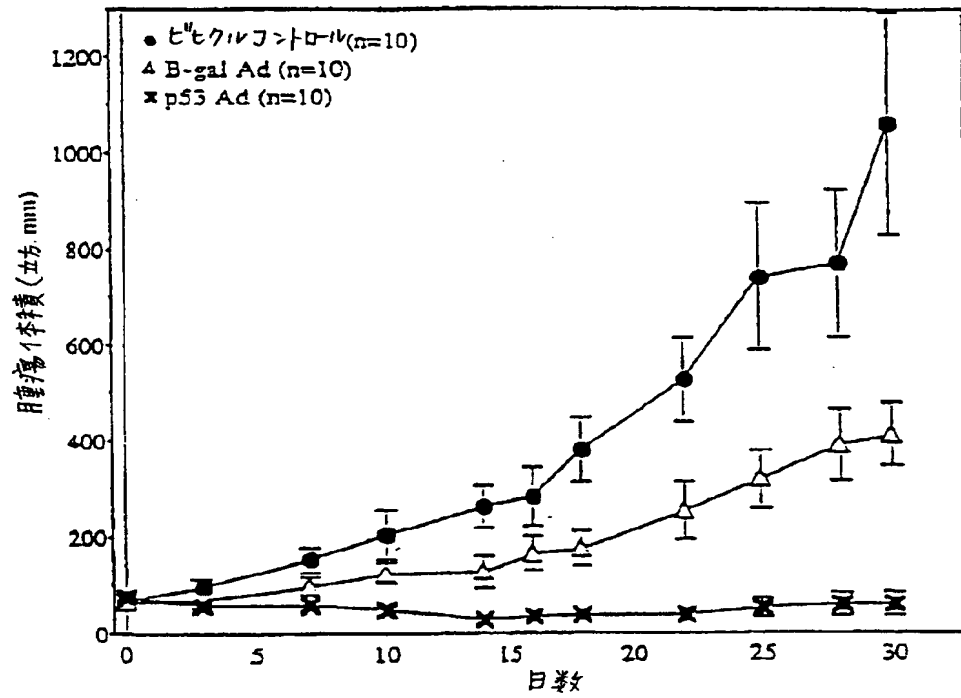
【図2】

Fig. 2



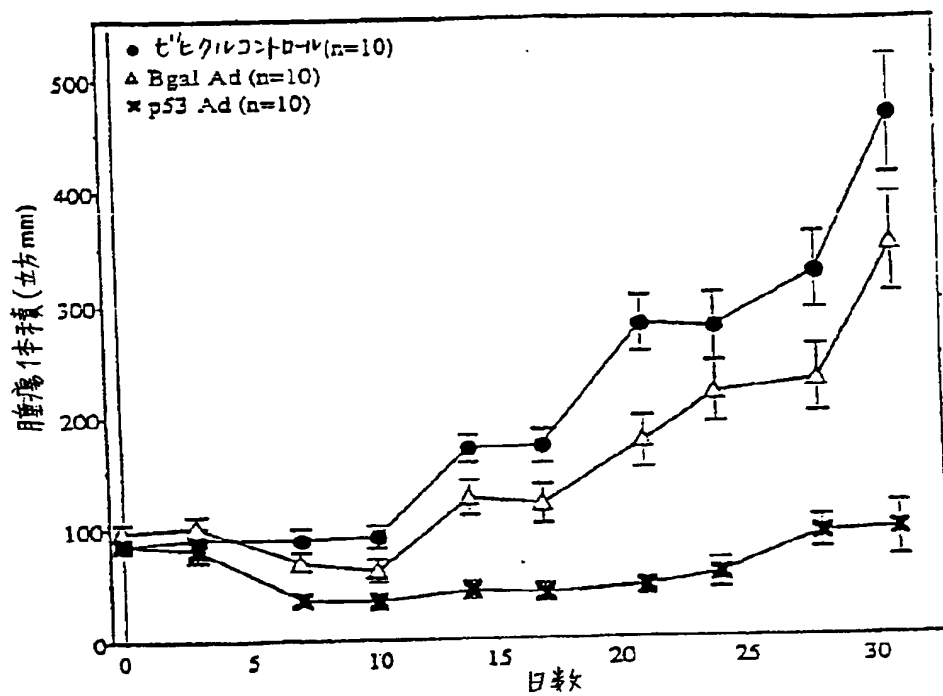
【図3】

Fig. 3a



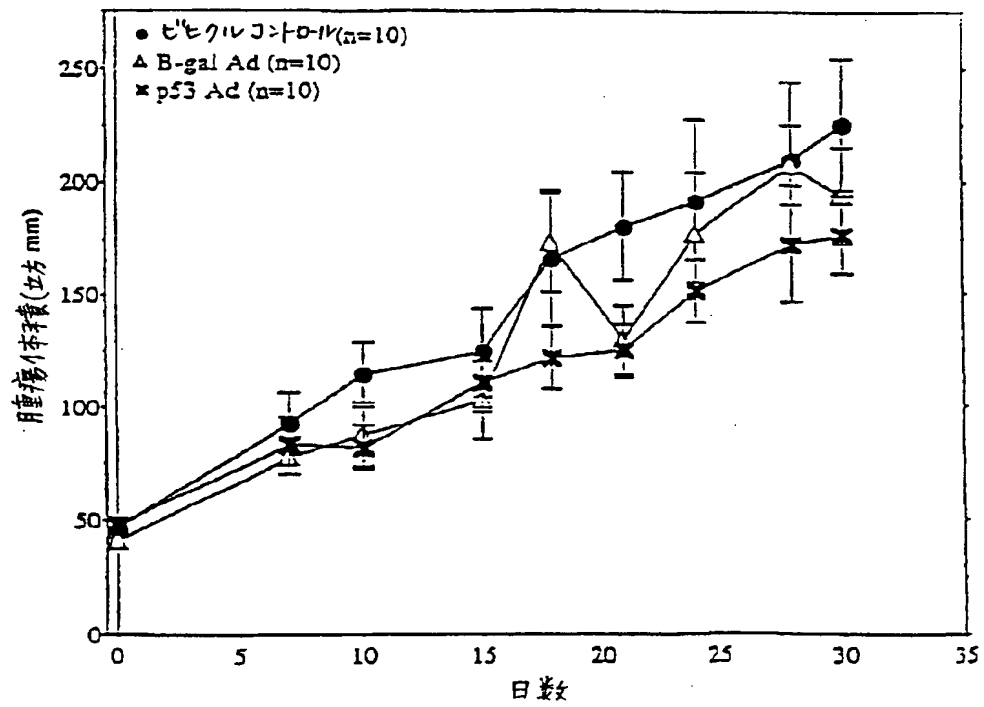
【図3】

Fig. 3b



【図3】

Fig. 3c



【図4】

Fig. 4a

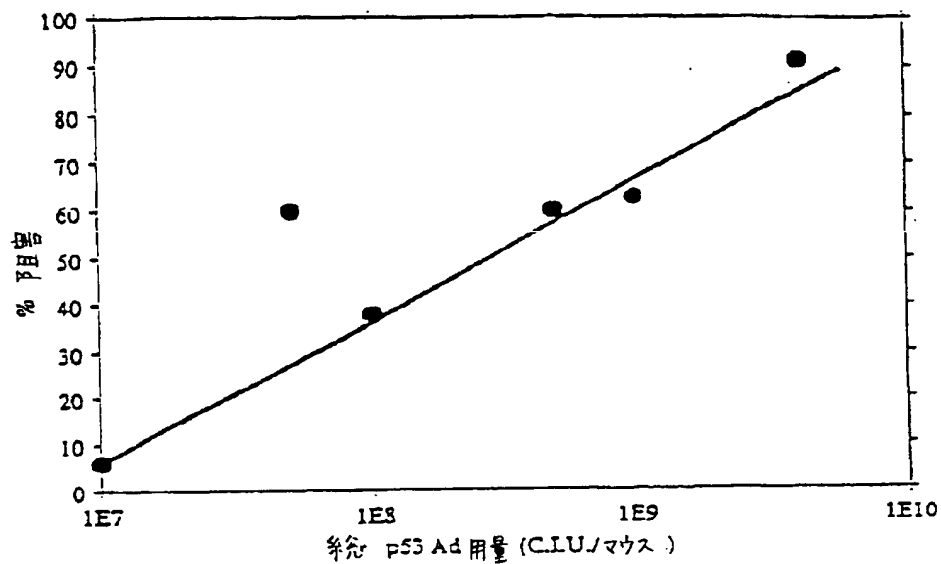
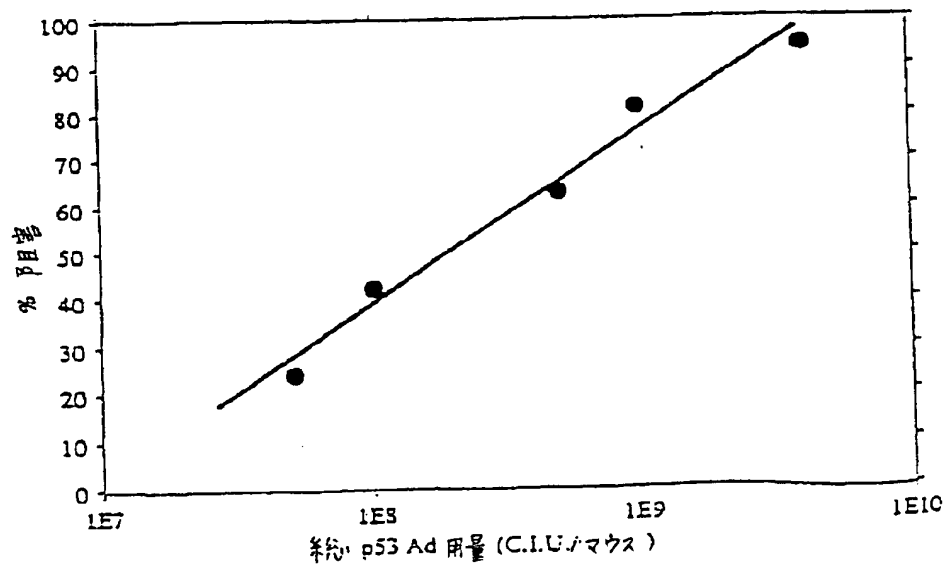


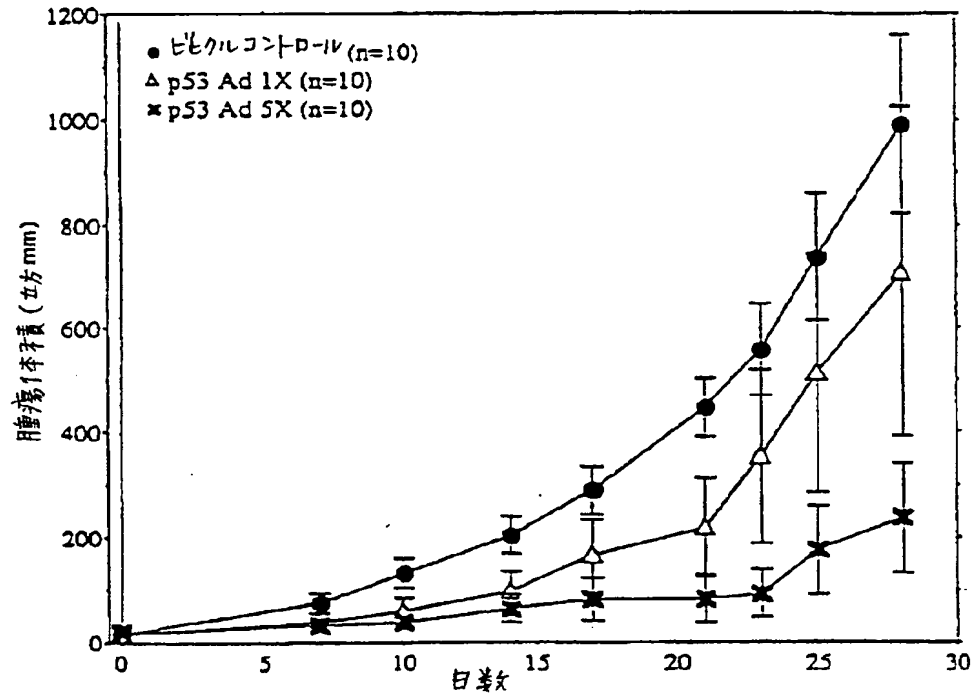
Fig. 4b





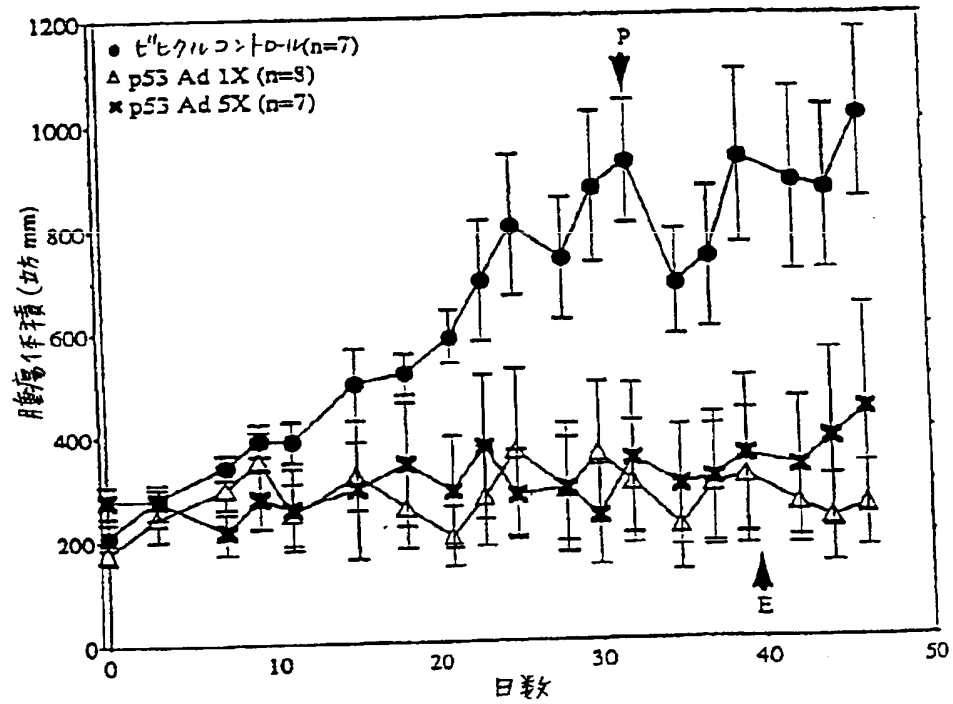
【図5】

Fig. 5



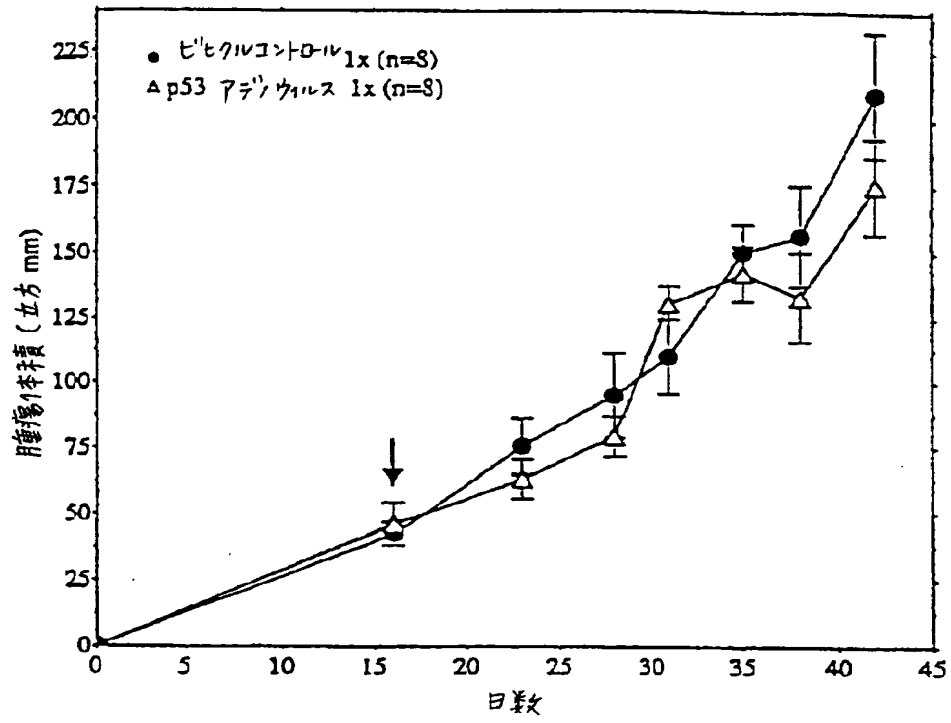
【図6】

Fig. 6



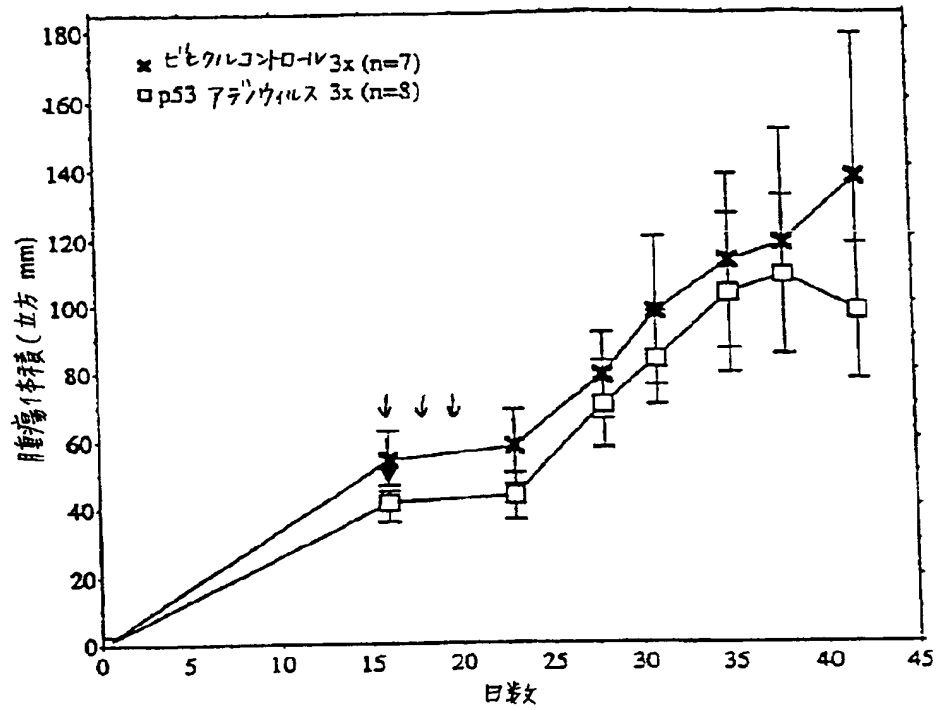
【図7】

Fig. 7a



【図7】

Fig. 7b

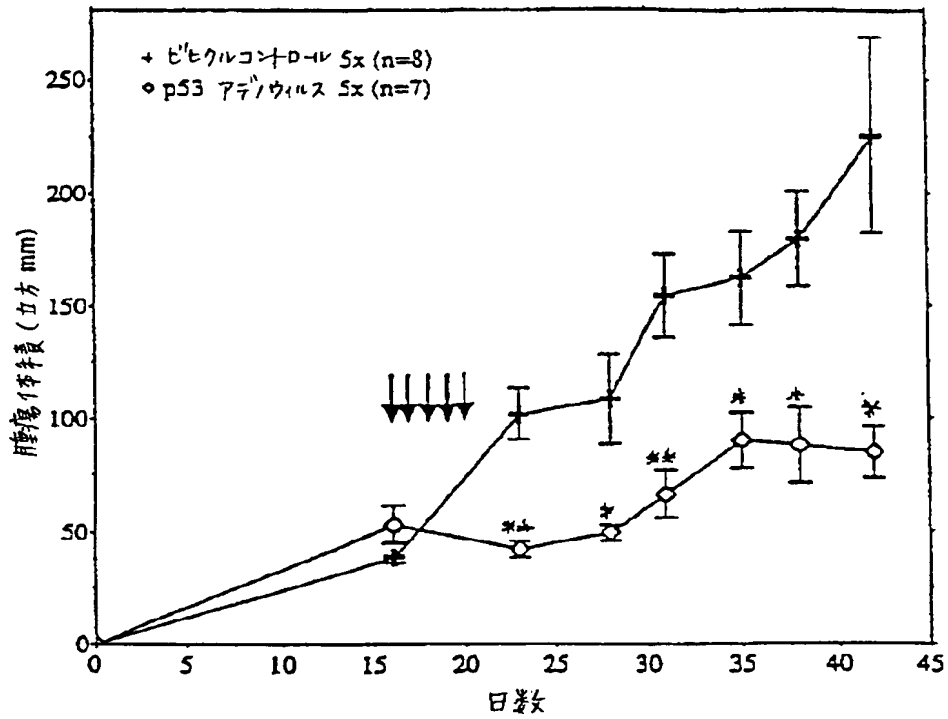


【図7】

Ge

Mice

Fig. 7c

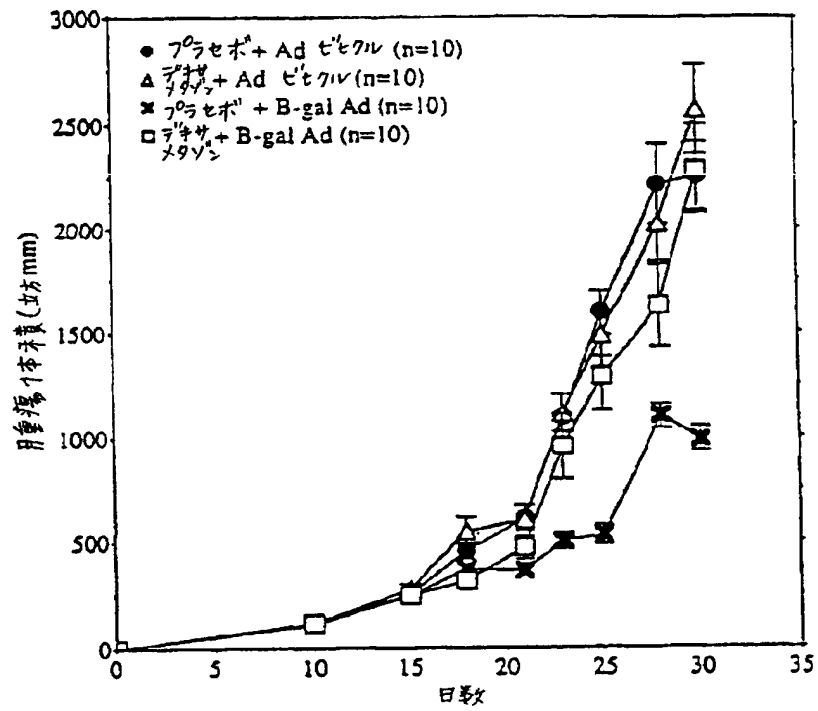


7. 検定  
 \*+  $p \leq 0.001$   
 \*  $p \leq 0.01$

7. 阻害  
 $\bar{x} = 55\%$

【図8】

Fig. 8



腫瘍対正常細胞

Fig. 9A

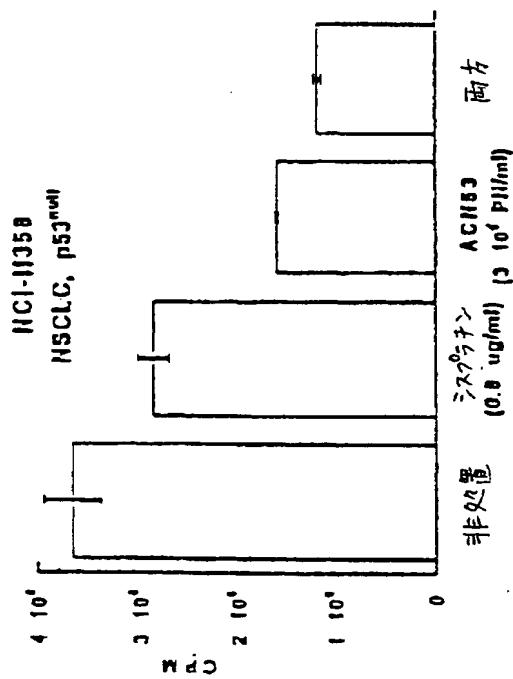
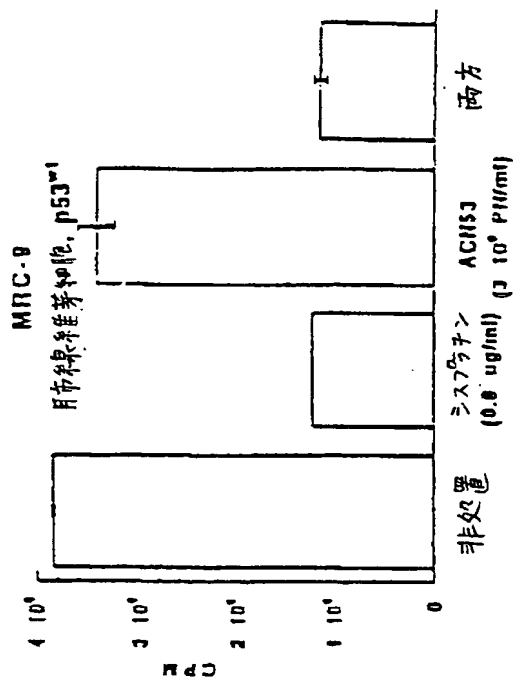
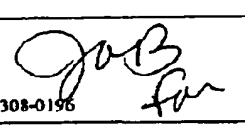


Fig. 9B



正常二倍体線維芽細胞 MRC-9 細胞は、  
より明白な効果を示さなかった。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US98/03514
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : A01N 37/18, 43/04, 51/00; A61K 31/70, 31/655, 38/00 US CL : 514/2, 44, 156 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 44, 156 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	DELIA, D. et al. p53 Activity and Chemotherapy. Nature Medicine. July 1996, Vol. 2, No. 7, pages 724-725, especially page 724.	1-40, 71-77, 52-70 -- 41-51
Y	TISHLER, R.B. et al. The Interaction of Taxol and Vinblastine with Radiation Induction of p53 and p21 waf1/cip1. British Journal of Cancer. 1996, Vol. 74, No. 27, pages S82-S85, especially page S82.	1-77
Y	HEHIR, K.M. et al. Molecular Characterization of Replication-Competent Variants of Adenovirus Vectors and Genome Modifications to Prevent Their Occurrence. Journal of Virology. December 1996, Vol. 70, No. 12, pages 8459-8467, especially page 8459.	9-17, 46-51, 57-62
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the (general) state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 JUNE 1998		Date of mailing of the international search report 23 JUN 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer YVONNE EYLER Telephone No. (703) 308-0196 

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

BEST AVAILABLE COPY



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US98/03514

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KALECHMAN, Y. et al. The Antitumoral Effect of the Immunomodulator ASI01 and Paclitaxel (Taxol) in a Murine Model of Lunge Adenocarcinoma. The Journal of Immunology. 1996, Vol. 156, No. 3, pages 1101-1109, especially page 1101	1-77
Y	BRINCKERHOFF, C.E. et al. Department of Health and Human Services National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Minutes of Meeting. Human Gene Therapy. August 1995, Vol. 6, No. 8, pages 1065-1124, especially pages 1082-1090.	1-77

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターミナル (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 37/02	
(31) 優先権主張番号	0 8 / 8 0 1, 7 5 5		
(32) 優先日	平成 9 年 2 月 18 日 (1997. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 8 0 1, 7 6 5		
(32) 優先日	平成 9 年 2 月 18 日 (1997. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 3 8, 0 6 5		
(32) 優先日	平成 9 年 2 月 18 日 (1997. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 4 7, 8 3 4		
(32) 優先日	平成 9 年 5 月 28 日 (1997. 5. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
(72) 発明者	ホロウィッツ, ジョー アン アメリカ合衆国 ニュージャージー 07033-0539, ケニルワース, ギャロッピング ヒル ロード 2015, ケイ-15-3-3315		
(72) 発明者	マネバル, ダニエル シー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, カバロ ストリート 12578		
(72) 発明者	デマーズ, ジー. ウィリアム アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, カーメル クリーク ロード ナンバー 177 12976		

- (72)発明者 ライバク, メアリー エレン  
アメリカ合衆国 ニュージャージー  
07059, ワレン, チェスターフィールド  
ドライブ 5
- (72)発明者 レズニック, ジーン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10583,  
スカーズデイル, セコー ロード 53

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>A01N 37/18, 43/04, 51/00, A61K 31/70, 31/655, 38/00</b>		<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 98/35554</b>
			<b>(43) International Publication Date:</b> 20 August 1998 (20.08.98)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US98/03514		<b>(74) Agents:</b> BASTIAN, Kevin, L. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US).	
<b>(22) International Filing Date:</b> 17 February 1998 (17.02.98)		<b>(81) Designated States:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(30) Priority Data:</b> 08/801,285 18 February 1997 (18.02.97) US 08/801,681 18 February 1997 (18.02.97) US 08/801,755 18 February 1997 (18.02.97) US 08/801,765 18 February 1997 (18.02.97) US 60/038,065 18 February 1997 (18.02.97) US 60/047,834 28 May 1997 (28.05.97) US		<b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>	
<b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> CANJI, INC. [US/US]; Suite 302, 3030 Science Park Road, San Diego, CA 92121 (US).			
<b>(72) Inventors; and</b>			
<b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> NIELSEN, Loretta [US/US]; 60 Midvale Avenue, Millington, NJ 07946 (US). HOROWITZ, Jo, Ann [US/US]; K-15-3-3315, 2015 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0539 (US). MANEVAL, Daniel, C. [US/US]; 12578 Cavallo Street, San Diego, CA 92130 (US). DEMERS, G., William [US/US]; 12976 Carmel Creek Road #177, San Diego, CA 92130 (US). RYBAK, Mary, Ellen [US/US]; 5 Chesterfield			
<b>(54) Title:</b> COMBINED TUMOR SUPPRESSOR GENE THERAPY AND CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF NEOPLASMS			
<b>(57) Abstract</b> <p>In one embodiment, this invention provides methods of treating mammalian cancer or hyperproliferative cells, said method comprising contacting said cells with a tumor suppressor protein or tumor suppressor nucleic acid and also contacting said cell with at least one adjunctive anti-cancer agent. The invention also provides for a pharmacological composition comprising a tumor suppressor protein or a tumor suppressor nucleic acid and at least one adjunctive anti-cancer agent, and a kit for the treatment of mammalian cancer or hyperproliferative cells.</p>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**